

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**(12) International Filing Published Based on Patent Cooperation Treaty**

**(19) (WIPO) World Intellectual Property Organization International Office**

**(43) International Publication Date: February 27, 2003**

**(10) International Publication No. WO 03/016907 A1**

---

**(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: G01N 33/53**

**(21) International Application No. PCT/JP02/08347**

**(22) International Filing Date: August 19, 2002**

**(25) Language of International Filing: Japanese**

**(26) Language of International Publication: Japanese**

**(30) Right of Priority Data:**

Patent Application 2001-247685 August 17, 2001 JP

Patent Application 2002-31181 February 7, 2002 JP

Patent Application 2002-106468 April 9, 2002 JP

**(71) Applicant (for all designated countries except the United States): Eisai Ltd. (official designation in English: EISAI CO. LTD). [JP/JP]; 4-6-10 Koishigawa Bunkyo-ku Tokyo, Japan (JP).**

**(72) Inventor: and**

**(75) Inventor / Applicant (only for the United States): Masahiko KATAYAMA) [JP/JP]; 527-51 Kami Hirooka, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan 305-0041 (JP). Noriko SANZEN) [JP/JP]; 18-2-202 Gansaku Sumida Nagakuzu-cho, Aichi-gun, Aichi-ken, Japan (JP). Kiyotoshi SEKIGUCHI) [JP/JP]; 3-13-1-301 Furue-dai, Fukita-shi, Osaka-fu, Japan 565-0874 (JP).**

**(74) Patent Agent: Tsutomu TOYAMA et al.; Yokoyama Building 6 FL, 3-4-10, Higashi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan 103-0004 (JP).**

**(81) Designated Countries (domestic): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**

**(84) Designated Countries (broad); ARIPO Patents (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia Patents (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patents (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

See [Guide Notes to Code and Abbreviations] which appear at the end of each of the *PCT* cassettes which are issued periodically for two-character code and other abbreviations.

**Appended Published Document:**  
**International Search Report**

**(54) [Title of Invention] Reagent for Assaying Laminin 5 Antigen in Biological Sample and Assay Method**

**(57) [Summary]**

A method for assaying laminin 5 contained in a biological sample which comprises (a) a step of bringing the biological sample into contact with an antibody reactive with a laminin 5  $\gamma$ 2 chain N end fragment; (b) a step of measuring the reaction of the antibody; and (c) a step of qualifying the laminin 5 antigen based on the results of the measurement of the reaction as described above; a method of measuring the laminin 5 antigen in the biological sample; and a method of detecting a laminin 5-producing cancer cell, a method of examining acute respiratory distress syndrome and a method of evaluating the malignancy of a malignant tumor cell each using the assay method indicated above.

## Specification

### Reagent for Assaying Laminin 5 Antigen in Biological Sample and Assay Method

#### Technical Field

The present invention relates to a method for assaying laminin 5 antigen in a biological sample and to an assay reagent.

#### Technical Background

A basement membrane is configured of an extracellular matrix constituent and exists universally *in vivo*. Laminin (hereinafter “LN”) is a polymer protein which makes up the basement membrane. Laminin is classified into some ten types depending on the structure each with its own different function and localized tissue. For example, it is classified by attaching a number to the end such as LN1 and LN2. All laminins are made by forming a complex with three polypeptide chains which have different amino acid sequences. When examined under an electron microscope, they have a cross-like molecular configuration. Three of these polypeptide chains are known respectively as  $\alpha$  chain,  $\beta$  chain and  $\gamma$  chain and there are several types of molecules in the respective chains ( $\alpha$  1 to  $\alpha$  5,  $\beta$  1 to  $\beta$  3 and  $\gamma$  1 and  $\gamma$  2).

A cellular adhesive structure which is inherent to the epithelial cells exists in the basement membranes which exist on the epithelial tissue and the connective tissue which lines the epithelial tissue. Laminin 5 (hereinafter abbreviated to “LN5”) is well known as an extracellular matrix structural protein which mainly exists in these. The biological characteristics of LN5 are such that it is produced only from the only epithelial cells in the aforementioned LN group and has an activity which promotes adhesion to the basement membrane of the epithelial cells as well as the motor functions. The epithelial cells adhere firmly to the basement membrane which comprises LN5 and LN5 via a specific receptor known as integrin on top of the cell membrane itself and the phenomenon whereby it wanders intensively is well known.

In this LN5, the  $\alpha$  3 chain,  $\beta$  3 chain and  $\gamma$  2 chain each form a complex. In particular, the  $\gamma$  2 chain is thought to be inherent to LN5 and is not contained in other types of LN molecules [Developmental Dynamics, 218, 213-234 (2000)]. It has also been found that LN5 undergoes decomposition in some regions due to protease when it is secreted from the epithelial cells. In particular, the N terminal part of the  $\gamma$  2 chain is cut so that the remaining LN5 molecules themselves in which the remaining N terminal part has become disengaged has an increased cell motion promotion activity [Journal of Cell Biology, 148, 615-624 (2000)].

This means that the amount of LN5 gamma 2 chain fragments which becomes disengaged from the epithelial cells and the like reflects the amount of LN5 produced and it is believed that it may be used as an index of measuring the motion promotion activity of the epithelial cells in the epithelial tissues due to LN5.

Recently, there have been a great many reports on research results indicating that the manifestation of LN5 increases in malignant tumor tissue originating in the epithelial cells. There have been a particularly large number of reports that indicate that the rate of manifestation of the LN5 correlates well with the infiltration characteristics of malignant tumors and it is believed that it may possibly be used as a pathology marker to diagnose cancer externally [**Journal of the National Cancer Institute**, **91**, 1882-1887 (1999) and **Cancer**, **85**, 2315-2321 (1999)].

However, in these studies, the pathological cells were excised by surgical and other means from the body of the patient and used as a section. Therefore, a method which carries out immunological staining of the manifestation sites of the target protein using antibodies is mainly used. When we actually proceed to apply this to external diagnosis in clinical practice, it is lacking in quantitative aspects and general purpose characteristics and at the same time, the physical burden of the surgical operations and the tissue biopsies on the patient are problematical. For this reason, there is a need to establish a method of simply and rapidly assaying the amount of LN5 antigens in the blood and other biological samples which can be collected comparatively safely.

Recently, there has been a report on a method of enzyme immunoassay using two types of monoclonal antigens (monoclonal antibody BM165 for the  $\alpha$  3 chain and monoclonal antibody 6F12 for the  $\beta$  3 chain) for the LN5 [**Journal of Immunological Methods**, **224**, 161-169 (1999)]. However, in this report, there are no cases in which the LN5 antigens in the biological sample are detected using ELISA.

### **Disclose of Invention**

It is an object of the present invention to provide a method for assaying the LN5 antigens contained in biological samples from minute amounts of said biological samples precisely and easily.

The inventors took note of the decomposition of LN5  $\gamma$  2 chain for the method of assaying the LN5 antigens in biological samples in the process of carrying out these studies. Therefore, the inventors produced monoclonal antibodies which recognize the various LN5 chains and immunologically analyzed the LN5 antigens in the supernatant of epithelial group cancer cell cultures. As a result, it was clarified that most of the epithelial group cancer cells secreted LN5 from which the gamma 2 chain had been cut in the supernatant of the culture thereof. It was also confirmed that the monoclonal antibodies to the  $\gamma$  2 chain which had been produced reacted with the gamma 2 chain fragments which had become disengaged as a result of the protease decomposition of the LN5.

Carrying the analysis further still, we produced multiple types of monoclonal antibodies which have reactivity relative to the  $\gamma$  2 chain fragments which become disengaged and we produced a sandwich type of immunoassay reagent which uses two different kinds of reactivity to the  $\gamma$  2 chain fragments. The inventors also found that it was possible to efficiently assay the LN5 antigens in the blood serum and blood plasma by using an assay reagent which makes use

of two different kinds of monoclonal antibodies which have reactivity relative to this LN5  $\gamma 2$  chain fragments.

As indicated previously, the  $\gamma 2$  chain has a constituent factor inherent to LN5 which is not contained in other types of LN molecules. This means that the assay reagent which uses antibodies for the  $\gamma 2$  chain fragment can be used to assay molecules in any of the  $\gamma 2$  chain fragments in biological samples or non-fragmented  $\gamma 2$  chains or  $\beta 3$  chain  $\gamma 2$  chain complexes or 3 chain  $\gamma 2$  chain complexes. We believe that it is a useful index of assaying virtually all of the LN5 antigens in the biological samples as well as a useful index in thoroughly understanding the pathology which reflects the amount of LN5 produced in the epithelial tissues.

We also carried out experimental studies on which the *in vivo* phenomenon is reflected by the increase in the LN5 antigens. We cultured 11 types of human pancreatic cancer cell stock for a constant period of time in a culture solution in the presence of 10 % fetal calf blood serum and compared the concentration of LN5 antigens in the supernatant of the culture and the amount of manifestation of a variety of integrins which are adhesion molecule receptors which manifest. In six types of LN5 production strains, the amount of manifestation of  $\beta 4$  integrin clearly tended to be higher than the five types of LN5 non-production strains. This means that the amount of LN5 antigen produced *in vivo* indicated experimentally that it can be used as an index of the amount of manifestation of  $\beta 4$  integrin in the epithelial tissues *in vivo*.

We transplanted the human tumors which produced the LN5 to a nude mouse and found that there was a correlation between the proliferation of tumors and the concentration of the LN5 in the blood serum. We clarified the fact that the proliferation of tumors which produce the LN5 can be monitored by assaying the LN5 in the blood serum .

We also set up a hypothesis whereby the LN5 metabolized *in vivo* increases in inflammatory diseases of the lung since a great deal of LN5 is contained in the *in vivo* organs particularly in the pulmonary epithelial cells. Behind this hypothesis was the fact that we measured the concentration of the LN5 antigens in the blood plasma specimens collected from patients with acute respiratory distress syndrome, hereinafter “ARDS”) as well as blood plasma specimens collected from healthy humans by using the method indicated above. The acute respiratory distress syndrome clearly indicates a high concentration in the blood and we found that it is extremely useful in clinical diagnosis of this disease.

The present invention was attained based on the findings indicated above. This means that the present invention provides the following.

1. A method for assaying laminin 5 antigens in biological samples which is comprised of (a) a step of bringing the biological sample into contact with an antibody reactive with a laminin 5  $\gamma 2$  chain N terminal fragment; (b) a step of measuring the reaction of the antibody; and (c) a step of qualifying the laminin 5 antigen based on the results of the measurement of the reaction as described above.

2. The method indicated in 1 above wherein the antibodies are monoclonal antibodies which are produced from cells which are deposited using deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-3134.
3. An assay reagent of the laminin 5 antigens in biological samples which contain antibodies which are reactive to the laminin 5  $\gamma$  2 chain N terminal fragments.
4. An assay reagent of the laminin 5 antigen indicated in 3 above in which the antibodies are monoclonal antibodies which are produced from cells which are deposited using deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134.
5. Monoclonal antibodies which are produced by cells deposited with deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134.
6. A method for detecting cancer cells which comprises (a) a step which assays the laminin 5 antigens in biological samples by using the method indicated in 1 or 2 above; and (b) a step which detects cancer cells which produce laminin 5 based on the assay results of the laminin antigens as indicated above.
7. A test reagent which is used to detect cancer cells which produce laminin 5 which contains the assay reagent indicated in 3 or 4 above.
8. A method for examining the acute respiratory distress syndrome which comprises (a) a step for assay of the laminin 5 antigens in the biological samples by using the method indicated in 1 or 2 above; and (b) a step for examining acute respiratory distress based on the results of assaying the aforementioned laminin 5 antigens.
9. A test reagent used for testing acute respiratory distress syndrome which contains the assay reagent indicated in 3 or 4 above.
10. A method for evaluating the malignancy of a malignant tumor which comprises (a) a step which assays the laminin 5 antigens in biological samples by using the method indicated in 1 or 2 above; and (b) a step which evaluates the malignancy of malignant tumors based on the assay results of the aforementioned laminin 5 antigens.
11. A test reagent used for evaluating the malignancy of malignant tumors which contains the assay reagent indicated in 3 or 4 above.
12. A method for measuring the manifestation of the beta 4 integrin which comprises (a) a step which brings the supernatant of a cell culture into contact with an antibody which is reactive to laminin 5; (b) a step which measures the reaction of the aforementioned antibody; and (c) a step of qualifying the  $\beta$  4 integrin of the aforementioned cells based on the results of assaying the reaction as indicated above.

### Brief Explanation of Figures

Figure 1 is a graph indicating the reactivity of each of the monoclonal antibodies (19, 57, 2B10, 8C2) to LN5 which originate in the culture solution of MKN 45 cells and A-172 cells. "Antiserum" indicates the reaction of anti-human LN5 mouse polyclonal antibodies. "PBS" indicates the reaction when the antibodies are not added. The horizontal axis of the graph is the absorbance value using ELISA.

Figure 2 indicates the results of immune precipitation experiments using a variety of antibodies to LN5 antigens in the HT-1080 cell culture solutions. The figures on the left indicate the migration potential of the molecular weight marker (kDa). "Supernatant of culture" is the migration image of the total protein. "Gel only" indicates the migration image of protein from the gel which has been used for immune precipitation. "pAb LN-5" is the migration image of the immune precipitation protein using the polyclonal antibodies to human LN5. "pAb  $\gamma 2$ " is the migration image of the immune precipitation protein to the polyclonal antibodies to human LN5  $\gamma 2$  chains. "mAb  $\beta 3$ " is the migration image of the immune precipitation protein using the monoclonal antibodies to the human LN5  $\beta 3$  chain.

Figure 3 indicates the results of the immune precipitation experiments carried out using the monoclonal antibodies to LN5 beta 3 chains. The number on the left indicates the migration potential of the molecular weight marker (kDa). "Supernatant of culture" is the migration image of the total protein. "Gel only" is the migration image of immune precipitation protein using the polyclonal antibodies to human LN5. "pAb  $\gamma 2$ " is the migration image of the immune precipitation protein using the polyclonal antibodies to human LN5  $\gamma 2$  chain. "mAb  $\beta 3$ " is the migration image of the immune precipitation protein using monoclonal antibodies to human LN5  $\beta 3$  chains.

Figure 4 indicates the results of measuring the concentration of LN5 in the supernatant of the human pancreatic cancer cell strains and MKN45 human stomach cancer cell strain cultures. " $\alpha 3 \gamma 2$ " is the value measured using ELISA using a combination of the 8C3 (anti- $\gamma 2$  monoclonal antibodies) solid phase plate and enzyme marker 2 B10 (anti- $\alpha 3$  chain monoclonal antibodies). " $\beta 2 \gamma 2$ " indicates the measured value using ELISA using a combination of an 8C3 (anti- $\gamma 2$  monoclonal antibodies) solid phase plate and the enzyme marker (anti- $\beta 3$  chain monoclonal antibodies). " $\alpha 3 \beta 3$ " is the measured value using ELISA using a combination of 57 (anti- $\beta 3$  monoclonal antibodies) solid phase plate and enzyme marker 2B10 (anti- $\alpha 3$  chain monoclonal antibodies).

Figure 5 indicates the results of comparing the amount of each of the integrin molecules manifested for 11 types of human pancreatic cancer cell stock. It indicates the mean value and the standard deviation of the amount of integrin manifested in the LN5 production strains (KP-2, KP-3, AsPC-1, HPAC, SUIT-2, BxPC-3) and the mean value and the standard deviation of the amount of integrin manifested in the LN5 non-producing strains (KP-1, KP-4, MIA paca-II, PSN-1 and PANC-1).

Figure 6 indicates the results of western block experiments using different monoclonal antibodies of the LN5 antigens in the BxPC-3 cell culture solutions. The number on the right is the migration potential of the molecular weight marker (kDa). "57" is a reaction antigen using



the 57 monoclonal antibodies. “8C2” is a reaction antigen using 8C2 monoclonal antibodies. “2B10” is a reaction antigen using 2B10 monoclonal antibodies. “18-4” is a reaction antigen using KP2-LN5-8C2E 18-4 monoclonal antibodies. “12-1” is a reaction to KP-2-LN5-8C2D 12-1 monoclonal antibodies. “control” is the reaction antigen using the control antibodies. The three types 8C2, KP2-LN5-8C2E 12-1, KP2-LN5-8C2E 18-4 clearly react to fragments with a molecular weight of approximately 50,000.

Figure 7 is the calibration curve using electrochemical luminous immunoassay which uses change to KP-2-LN5-8C2E 18-4 monoclonal antibody solid phase beads and ruthenium marker KP-2-LN5-8C2 E 12-1 monoclonal antibodies.

Figure 8 indicates changes in primary tumor weight (  $\lambda$  ) and concentration of LN5 antigens in blood serum ( O ) in the second, third, fourth and fifth weeks after grafting of HPAC cells to nude mice.

Figure 9 indicates changes in primary tumor weight (  $\lambda$  ) and concentration of LN5 antigens in blood serum ( O ) in the second, third, fourth and fifth weeks after grafting of MIApaca-II cells to nude mice.

Figure 10 indicates changes in primary tumor weight (  $\lambda$  ) and concentration of LN5 antigens in blood serum ( O ) in the second, third, fourth and fifth weeks after grafting of KP-1 cells to nude mice.

Figure 11 indicates the distribution, mean value and standard deviation of the concentration of LN5 antigen in the blood plasma of 27 patients with ARDS and 15 healthy people. ARDS has been divided into 19 patients who survived (mild cases) and 8 patients who died (serious cases).

Figure 12 indicates the distribution of the concentration of the LN5 antigen in the blood serum in 31 patients with digestive organ group benign diseases, 9 patients with mucous producing pancreatic tumors and 155 patients with digestive organ group malignant tumors.

### **Optimal Mode of Carrying Out the Present Invention**

By “LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment” in this Specification is meant the fragment on the N terminal side of those fragments which arise when  $\gamma$ 2 chain is decomposed. The N terminal fragment is a fragment which can disengage in the biological samples, that is, it is a fragment which can exist in the biological samples which are liquid samples or which can exist in the liquid fraction which is produced from the biological samples. A fragment with a molecular weight of approximately 50,000 and which contains  $\gamma$ 2 chain domains IV and V is an example of this type of N terminal fragment.

By “antibody which is reactive with the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment” in this Specification is meant antibodies which bond immunochemically to the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment, that is, antibodies which have an antigen antibody reaction.

The biological samples referred to in this Specification are liquids such as blood serum, blood plasma, cerebrospinal fluid, ascites fluid, urine, tears, sweat and sputum and discharges and tissue extractives. There are no particular restrictions on these as long as they can normally be collected by medical institutions and the like, however, blood serum and blood plasma from subjects in tests and other blood samples are particularly suitable.

By "LN5 antigen" in this Specification is meant an antigen in which an antibody which is reactive with an LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment immunochemically and a complex which contains an LN5  $\gamma$ 2 chain and an N terminal fragment and a  $\gamma$ 2 chain are contained.

Aside from using an antibody which is reactive with the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment, the same type of method used to measure the antigen can be used as the step which brings the biological sample in contact with an antibody which reacts with the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment immunochemically can be used as the step which measures the reaction of the aforementioned antibody and the step which determines the amount of LN5 antigen based on the results of measuring the aforementioned reaction in the method used to measure the LN5 antigen in the biological sample.

In the assay method in the present invention, the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment which is decomposed and secreted in the bodily fluids and which can be assayed from the biological samples should be assayed using an immunochemical method which uses antibodies, which are reactive with this LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment, preferably monoclonal antibodies and preferably monoclonal antibodies which are produced by cells which are deposited with deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134.

The immunochemical method used here may be the latex aggregation method, the competition method, the sandwich method and the like although there are no particular restrictions on which method must be used. When the competition method and the sandwich method are used, the respective LN5 antigens or antibodies are detected by using a method which is suitable for labeling such as radioactive labeling, enzyme labeling, electrochemical labeling (ECL) or fluorescent labeling or labeling using other labeling substances.

The assay reagent in the present invention is an assay reagent which is used for the assay method in the present invention. It should at the very least contain an antibody which is reactive with the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment, or a monoclonal antibody or preferably a monoclonal antibody which is produced by cells which are deposited using deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134 and depending on the case, may contain an LN5 standard antigen, a detection reagent for said labeling which is suitable for the type of labeling, for example, an enzyme matrix. A carrier which is authorized for use in an assay reagent and a label are bonded to the antibodies and may be used as an immobilized antibody and a labeled antibody. The assay reagent may also contain a suitable buffer. The assay reagent in the present invention may be produced by selecting a technique which is normally used in the production of a reagent which contains antibodies. When the assay reagent is made up of multiple constituents, it may be provided in the form of a kit.

There are no particular restrictions on the antibodies which are reactive with the LN5  $\gamma$ 2 N terminal fragment as long as they have an affinity with the polyclonal antibodies and other LN5  $\gamma$  2 chain N terminal fragments which are derived from the antiserum which are obtained by immunization of refined LN5  $\gamma$  2 chain terminal fragments in animals used in experiments and mouse monoclonal antibodies are optimal since they have outstanding reactive specificity and production costs are low.

Next, we shall explain how the monoclonal antibodies are produced. Human LN5 has been refined by using a method which has already been reported on [**Int. Journal of Cancer**, 76, 63-72 (1998)]. Refined LN5 or refined LN5  $\gamma$  2 chain fragments are dissolved in saline and the like as immunological antigens and they are administered internally to experimental animals along with an adjuvant. The experimental animals used may be obtained from a dealer and there are no particular restrictions on these although Balb/C mice are often used. The antigens are administered several times repeatedly at intervals of several weeks. Three days after the last administration of antigen has been carried out, the spleen is extracted from the immune animals. The extracted spleen cells are dispersed to the individual cells and cell fusion is carried out in the presence of mouse myeloma cells and a polyethylene glycol reagent which has been cultured in advance. A selective culture is carried out after cell fusion using the reagent and only the hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies which are reactive with the LN5  $\gamma$ 2 chain N terminal fragment are selected. Then, the antibody producing cells are planted as complete monoclonal antibody producing cells in several cloning operations. The specificity of the monoclonal antibodies may be confirmed by isolating the refined antigens used for immunization by electrophoresis and subjected to western blotting analysis [**Antibodies: A Laboratory Manual**, by Ed Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)].

The antibodies which are produced by cells which are deposited in independent administrative entity Industrial and Technological General Research Institute Patent Microorganism Deposit Center under deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134 may also be used as monoclonal antibodies.

Next, we shall describe the ECL method. A number of different assay methods are known for ECL assay of LN5 antigens in biological samples. The sandwich method which uses first antibody solid phase magnetic beads and second antibodies which are labeled by using a ruthenium complex simultaneously is particularly suitable. The first antibodies and second antibodies in this case react specifically with LN5  $\gamma$ 2 chain fragments, however, they should bond to different antigen determinants.

The standard antigen can be produced by refining from human cancer cell strains such as the culture supernatant of human cancer cell strains and by determining the concentration of the protein using absorbance analysis and the like. It can be used by diluting to a suitable concentration using a diluent.

Next, we shall describe an example of the assay procedures although it should by no means be construed that the present invention is restricted to this.

The LN 5  $\gamma$ 2 chain fragment antibody (first antibody) is brought to a solid phase by using commercially available magnetic beads. The conversion to a solid phase may be carried out by covalent non-covalent bonding. Next, milk casein and other blocking proteins which are used to reduce the non-specific bonding to the magnetic beads of the other molecules are adsorbed.

A standard LN5 antigen solution or the biological sample being studied with a concentration which is known in advance is added to this and it is stirred for a constant period of time. After the LN5 antigens in the samples are adsorbed to the surface of the particles which are connected by the antigen, the particles are washed. This time, another anti LN5  $\gamma$ 2 chain fragment antibody (second antibody) which has been labeled with a chemically luminous complex of ruthenium and the like at an appropriate concentration, is stirred for a constant period of time and a complex with three [sic] constituents—the first antibody and the second antibody is formed on top of the magnetic beads.

Then, the beads are washed and the complex which is the labeled substance is made luminous via a current between the electrodes of a dedicated device and the luminescent strength is measured. At this time, a degree of luminescence can be obtained which is in keeping with the amount of the ruthenium marker. By comparing the amount of luminescence of the biological sample being studied and the amount of luminescence of the standard product using the calibration line and the like, the amount of LN5 antigen in the biological sample being studied can be found precisely.

The method of detecting the cancer cells which produce the LN5, the method of examining the acute respiratory distress syndrome and the method which evaluates the malignancy of the malignant tumor in the present invention are characteristic in that they are used to measure the LN5 antigen in the biological sample and detect, test and evaluate based on the measuring results.

Assaying the LN5 antigen in the biological samples is carried out by using the assay method in the present invention. By using the results of assaying the LN5 antigen as an index, the cancer cells which produce the LN5 are detected, the acute respiratory distress syndrome is examined or the malignancy of the malignant tumor is evaluated. For example, the quantitative values of the LN5 antigen and the cancer cells which produce LN5 are detected when higher than the normal value, the acute respiratory distress syndrome was detected or the malignancy of the malignant tumor was evaluated as high.

The assay reagent in the present invention can be used to detect the cancer cells which produced the LN5, to examine the acute respiratory distress syndrome and the malignancy of the malignant tumor.

The present invention provides a method of measuring the manifestation of the  $\beta$  integrin of the cells. This method comprises (a) a step which brings the supernatant of the cell culture with the antibodies which are reactive with the LN5; (b) a step which measures the reaction of the aforementioned antibody; and (c) a step which measures the amount of  $\beta$  4 integrin manifestation in the aforementioned cells based on the measuring results of the aforementioned reaction.

The step which brings the supernatant of the cell culture in contact with the antibody which is reactive with the LN5 and the step which measures the reaction of the aforementioned antibody, aside from using the antibody which is reactive with the LN5, can be used in the same way as the method for assaying the antigen using the usual immunochemical method. The immunochemical method may be used in the same way as explained above regarding the assay method in the present invention.

The antibodies which are reactive with the LN5 should be monoclonal antibodies and monoclonal antibodies which are produced using cells which are deposited under the deposit numbers FERM BP-8133, FERM BP-8134, FERM BP-8135, FERM BP-8136, FERM BP-8137 or FERM BP-8140 as this type of monoclonal antibodies.

The results of measuring the reaction of the antibodies which are reactive with the LN5 reflect the amount of LN5 produced on the culture supernatant and the amount of  $\beta$  4 integrin can be determined by using this as an index.

### **Practical Embodiments of the Invention**

Next, we shall provide specific embodiments of the present invention, although it should by no means be construed that the present invention is restricted to these embodiments.

#### **[Practical Embodiment 1] Producing Monoclonal Antibody to LN5**

We refined human LN5 according the method indicated in [International Journal of Cancer, 76, 63-72 (1998)] which has already been reported on. This means that human breast cancer cells MKN 45 (obtained from the Japan Cancer Research Resources Bank) were cultured in a liquid culture medium containing 2.5 % fetal calf serum and 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13- acetate (produced by Wako Junyaku Ltd.). Then, we collected the culture supernatant, centrifuged it and removed the cell constituents and then added a protease inhibitor to the supernatant. We flushed this culture supernatant in a column into which had been packed a gel of immobilized anti-LN5  $\gamma$ 2 chain polyclonal antibodies and washed it thoroughly using phosphoric acid buffer saline (PBS). The LN5 which had bonded to the column was eluted by using a 0.1 M glycine—hydrochloric acid buffer solution (pH 3.0). We quickly neutralized the LN5 which had been eluted from the column, placed it in a dialysis tube and dialyzed it thoroughly relative to the PBS. We analyzed the LN5 sample which was refined in this way using polyacrylamide electrophoresis and confirmed the presence of an  $\alpha$  3 chain and a  $\beta$  3 chain and a  $\gamma$ 2 chain.

We administered this refined LN5 along with a complete Freund adjuvant (produced by Sigma Aldrich Ltd.) at 0.015 mg per animal. We administered peritoneally the same amount of LN5 three weeks later along with an incomplete Freund adjuvant (produced by Sigma Aldrich Ltd.). We again administered 0.03 mg per animal of only the refined LN5 to the same mice three weeks later.

We extracted the spleen from the mice three days later when the last immunization had been completed. The operations thereafter were carried out inside a sterile green bench. We dispersed the spleen which had been extracted using mesh, mixed it with Sp2/0-Ag14 mouse

myeloma which had been cultured beforehand and carried out cell fusion in the presence of 50 % polyethylene glycol 1500 (produced by Boehringer Mannheim Ltd.). The hybridoma cells which had been fused were dispersed to several 96-well microculture plates and cultured it for one to two weeks in an RPMI 1640 liquid culture containing 10 % fetal calf serum and HAT reagent (produced by ICN Biomedical Ltd.). Only the hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies in a stable fashion are present during this time and the myeloma cells which did not fuse and the mouse spleen cells had died out.

Selection of the cells which produce the monoclonal antibodies to the LN5 was carried out using ELISA using an antigen solid phase plate. This means that the culture supernatant was collected when the colonies in the hybridoma cells are sufficiently cultured are added to a 96-well microplate (produced by Narger Nunc Ltd.) to which the immune antigens adsorb having formed a solid phase and the monoclonal antibodies in the supernatant are reacted. After this, we added a secondary antibody peroxidase marker (produced by American Colex Inc.) which reacts with mouse IgG in an appropriate concentration. We washed the plate after a constant period of time and added an orthophenylene diamine enzyme substrate color development agent (produced by Wako Junyaku Ltd.) and a solution of hydrogen peroxide. We selected four of the desired monoclonal antibody producing hybridoma strains depending on whether there was color development. The four strains selected were cloned respectively several times and designated them 19, 57, 8C2 and 2B10. Mass production of the respective monoclonal antibodies was carried out by inoculating the hybridoma peritoneally to the mice according to the regular method and by refining using affinity chromatography using a protein G immobilized cephalose gel (produced by Pharmacia Ltd.) from the mouse ascites fluid.

We studied the specificity of the monoclonal antibodies obtained using the LN5 which produced the human breast cancer cell MKN45 cells, the human glioblast strain A-172 cells, human smooth muscle tumor cells strain HT-1080 cells and human [species] epidermal cancer cell strain A-431 cells. The A-172 cells were obtained from the American Type Culture Collection and the HT-1080 cells and A-431 cells were obtained from the Japan Cancer Research Resources Bank.

We cultured the respective cells in a tissue culture flask in an RPM 1640 culture medium which contained 10 % fetal calf serum and collected the culture supernatant. We refined the LN5 by using the aforementioned method from the culture supernatant. The A-172 cells are known to secrete  $\gamma 2$  chains as a simple substance and the LN5 which was refined has a  $\gamma 2$  chain is the main constituent. On the other hand, the LN5 which is derived from the MNK45 cell strain culture supernatant contains virtually the same amount as the  $\alpha 3$  chain and the  $\beta 3$  chain and the  $\gamma 2$  chain. We compared the reactivity of the four types of monoclonal antibodies relative to these two types of LN5 using ELISA based on the aforementioned method. Results indicate that only the 8C2 reacted strongly with the other two so that it was found that the 8C2 monoclonal antibodies confirmed the LN5  $\gamma 2$  chain (Figure 1).

We also labeled the secreted protein using an express  $^{35}\text{S}$  protein labeling mix reagent (produced by NEN Life Sciences Ltd.) when we cultured each of the HT-1080 and A-431 cells. We carried out immune precipitation of the antigen protein using the four types of monoclonal antibodies using the culture supernatant. This means that we added the antibodies to a constant

amount of each of the cell culture supernatants which had undergone  $^{35}\text{C}$  labeling and added a gel of immobilized anti-mouse IgG antibodies. After a short period of time, we stirred it slowly and isolated the gel by low-speed centrifuging, heated it as is with a sample solution containing SDS and isolated the antigen protein which had become adsorbed to the gel using electrophoresis.

The HT-1080 cells are known not to manifest an  $\alpha 3$  chain and to secrete a complex made up of a  $\beta 3$  chain and a  $\gamma 2$  chain. On the other hand, the A-431 cells are known to manifest all of the chains. The results of the electrophoresis analysis of this immune precipitate indicated that 19 and 57 reacted strongly with the antigen ( $\beta 3$  chain) which migrated to a position with a molecular weight of approximately 145kDa from the HT-1080 supernatant (Figure 2). The 2B10 reaction antigen was not detected in the HT-1080 supernatant. The four types of monoclonal antibodies precipitated a three-chain complex made up of an  $\alpha 3$  chain, a  $\beta 3$  chain and a  $\gamma 2$  chain from the A-431 cell supernatant (Figure 3).

Based on these experimental results, it was found that 19 and 57 reacted with the  $\beta 3$  chain, 2B10 reacted with the  $\alpha 3$  chain and the 8C2 reacted with the  $\gamma 2$  chain. 19 and 57 both reacted in the same way with the  $\beta 3$  chain so that we used only 57 in succeeding studies.

#### **[Practical Embodiment 2] Assaying Amount of LN5 in Human Cell Culture Supernatant using Monoclonal Antibodies**

We obtained eleven types of human pancreatic cancer cell strains (KP-1, KP-2, KP-3, KP-4, AsPC-1, HPAC, SUIT-2, MIApaca-II, PSN-1, BxPC-3, PANC-1: MIApaca-II (CRL-1420), PANC-1 (CRL-1469), AsPC-1 (CRL-1682) and HPAC (CRL-2119) from ATCC. KP-1 to KP4, SUIT-2 and BxPC-3 were kindly donated by Professor Akihiro Funakoshi of the National Kyushu Cancer Center. PSN-1 was donated by Professor Masando Nishio of the National Cancer Center) and cultured them in an RPMI-1640 culture medium with 10 % fetal calf serum added in a culturing flask and we collected the culture supernatant of this in stages where they had been sufficiently grown. We sealed the culture supernatant hermetically and antiseptically and stored it at 4°C until it was to be used.

Of the three types of monoclonal antibodies which were produced in Practical Embodiment 1 and whose specificity had been confirmed (57, 2B10, 8C2), the 57 and 2B10 monoclonal antibodies were labeled by using [Western] horseradish [*Armoracia lapathifolia*] peroxidase using the periodic acid method. Each of the monoclonal antibodies labeled were dialyzed sufficiently relative to the PBS, filtered and sterilized with a membrane filter (manufactured by Nippon Millipore Ltd.) and then stored it at 4°C. We diluted either the 57 or the 8C2 refined monoclonal antibodies using PBS so that it was 0.01 mg/mL. We added 0.2 mL to each of the wells of a Maxisorb 96-well microplate (manufactured by Narger Nunc Ltd.) and immobilized each of the antibodies. We sealed these plates hermetically so that they did not dry and kept them stationary at 4°C and under for 12 hours. Then, we discarded the antibody solutions in the plates, added 0.2 mL of a PBS solution containing 1 % skim milk to each of the wells and kept them stationary for 1 hour so that blocking was carried out for each of the plates.

We diluted the human LN5 standard product (derived from MKN45 cells) in a PBS solution containing 1 % skim milk and produced the solutions so that the concentration was 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ng/mL. We discarded the blocking solution from the antibody solid phase plates for which blocking had been completed and we added each of the human LN5 concentration standard product and the culture supernatant of 11 types of human pancreatic cancer cells which had already been collected to the wells so that there was 0.1 mL in each well. We kept these stationary for two hours as is at room temperature, discarded the liquid and washed these sufficiently using PBS. The peroxidase markers for the aforementioned 57 or 2B10 monoclonal antibodies were diluted as appropriate using a PBS containing 1 % skim milk and 0.1 mL of this was added to each of the wells. We kept these stationary as is for two hours at room temperature, discarded the liquid and washed them thoroughly using PBS. We added 0.1 mL of an ABTS enzyme substrate solution (produced by Roche Diagnostics Ltd.) to each of the wells and kept them stationary for ten minutes at room temperature while stirring from time to time. We added a 0.1 mL of a 2 mM sodium azide aqueous solution to each of the wells in order to stop the reaction and mixed them. We measured the absorbance at 492 nm in each of the wells using a T-max microplate reader (manufactured by Molecular Device Ltd.), produced a calibration line from the absorbance of the standard product and calculated the LN5 concentration in each of the culture supernatants.

In assay results, production of LN5 was confirmed in part of the human pancreatic cancer cell stock and the LN5 assay value found by using ELISA which used the 8C2 monoclonal antibodies as the solid phase antibodies were clearly lower than the LN5 assay value found by using ELISA which did not use the 8C2 monoclonal antibodies (Figure 4). However, no trend toward lower values was detected in the culture supernatant of the MKN 45 cells. The MKN 45 derived cells are such that the  $\gamma 2$  chain is known not to fragment and we believe that 8C2 has a reactive specificity to the disengagement fragment site of the  $\gamma 2$  chain.

In addition, the aforementioned eleven kinds of human pancreatic cancer cells were recovered from the flask using trypsin processing in the same way as the culture supernatant was collected, the number of cells was calculated and then injected individually so that there were the same number of cells in the microtube. We added the monoclonal antibodies (from Chemicon Ltd.) relative respectively to the human  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  and  $\beta 4$  integrin to each of the tubes, kept these stationary for 30 minutes while cooling with ice and then washed the cells using PBS. We added FITC label second antibodies and kept these stationary for 30 minutes while cooling with ice. Last of all, we washed these using PBS and then added a 1 % paraformaldehyde fixing solution and immobilized the cell surface antigens. We measured the fluorescent strength mean absorbance value of the cell surface of each of the immobilized cell flotation solution on a FACS cell analyzer (manufactured by Nippon Becton Dickinson Ltd.) and made this the amount of manifestation of each of the integrin on the cell membrane surface. The fluorescent strength mean value was indicated as the ratio to the background mean value (relative mean fluorescence).

Of the eleven kinds of human pancreatic cancer cell strains, we compared the manifestation of each type of integrin in six kinds of LN5 producing strains and five kinds of LN5 non-producing strains (Figure 5). Compared to the LN5 non-production strain, the LN5 producing strain clearly showed an increase in the manifestation of  $\beta 4$  integrin regardless of the



fact that the manifestation of  $\beta$  1 integrin and the like was virtually the same and the amount of LN5 produced was an index of the manifestation of  $\beta$  4 integrin.

### **[Practical Embodiment 3] Producing Monoclonal Antibodies for $\gamma$ 2 Chain Decomposition Fragments**

We bridged the refined 8C2 monoclonal antibodies according to the written instructions for use of bromcyan activated cephalose (from Pharmacia Ltd.) and produced an antibody solid phase gel. We cultured large amounts of the human pancreatic spleen cancer cell strain KP-2 or BxPC-3 in a tissue culture flask in an RPMI-1640 liquid culture medium which contained 10 % fetal calf serum. After we cultured this sufficiently, we collected 1 L of the culture supernatant and removed the cell constituents. We diluted the culture supernatant using PBS and flushed it in a column packed with 8C2 monoclonal antibody immobilized gel. We washed the column sufficiently with the PBS and then eluted the LN5 antigen which had bonded to the column using PBS which contained 8 M urea. We placed the eluted fraction in a dialysis tube and dialyzed it relative to the PBS and removed the urea. After we carried out the dialysis sufficiently, we concentrated it in a Centricon centrifugal concentration device (from Amicon Ltd.) and used this as the refined human LN5 antigen.

We isolated this refined product using 4-20 % gradient SDS polyacrylamide electrophoresis (from Daiichi Chemical and Pharmaceutical Ltd.). We carried out protein staining on the gel using a Quick CBB staining solution (produced by Wako Junyaku Ltd.) and analyzed the molecular weight of the LN5 antigen. We also transcribed the LN5 antigen from the gel which had been subjected to electrophoresis in the same way using an Immobilon-P membrane (produced by Nippon Millipore Ltd.) and carried out immunological staining using the 8C2 monoclonal antibodies (Figure 6). It was assumed that there were approximately 50,000 decomposition products which reacted to the 8C2 monoclonal antibodies and we believe that this is a fragment (N terminal fragment) which is derived from the  $\gamma$  2 chain N terminal whose disengagement brought about by decomposition by the protease is suggested in previous reports [Science, 277, 225-228 (1997)]. The refined human LN5  $\gamma$  2 chain N terminal fragment obtained here was injected without adding any preservative and frozen and stored until used.

### **(2) Producing Monoclonal Antibodies for $\gamma$ 2 Chain Decomposition Fragment**

We used the refined  $\gamma$  2 chain N terminal fragment derived from the KP-2 cells which had been kept in frozen storage as the immunogen and produced the new monoclonal antibodies. We produced the monoclonal antibodies based on the method indicated in Practical Embodiment 1. We again obtained two types of monoclonal antibodies KP2-LN5-8C2E 12-1 (hereinafter abbreviated to "12-1") and KP2-LN5-8C2E 18-4 (hereinafter abbreviated to "18-4"). We confirmed that both of these monoclonal antibodies reacted with a  $\gamma$  2 chain fragment with a molecular weight of approximately 50,000 like 8C2 (Figure 6).

Large amounts of the respective monoclonal antibodies were produced from the culture supernatant of the hybridoma cells using a Hybridoma-SFM non-serum culture medium (from Gibco Ltd.) by refining the affinity using a protein A immobilizing gel. All of the monoclonal antibodies obtained were confirmed to be the IgG1 type by using a Mouse-Typer Isotyping Panel reagent (produced by Nippon Biorad Ltd.).

The monoclonal antibody producing cells obtained (12-1, 18-4, 2B10, 8C2, 19 and 57) were deposited at independent administrative entity Industrial and Technical General Research Institute Microorganism Deposit Center (address: Central 1, 1-1-1 Higashi Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan 305-8566) on August 16, 2004 under the deposit names FPRM P-18465, FPRM P-18466, FPRM P-18467, FPRM P-18468, FPRM P-18469 and FPRM P-18470. These were transferred for international deposit based on the Budapest Convention on August 1, 2002 (August 5, 2002 for 57) and the deposit numbers FERM BP-8133, FERM BP-8134, FERM BP-8136, FERM BP-8137 and FERM BP-8140.

### **(3) Assaying LN5 Decomposition Product in Biological Samples**

We prepared the two types of anti-human LN5  $\gamma$ 2 chain monoclonal antibodies (12-1 and 18-4) obtained in (2) and used them as refined IgG.

We diluted the 18-4 monoclonal antibody refined product with PBS and used this as the final concentration of 0.2 mg/mL. We added 0.25 mL of Dynabid M-450 epoxy (produced by Dynal Ltd.) floating solution to 1 mL of the antibody solution, sealed in an airtight polypropylene container and stirred it gently at room temperature for 4 hours. Then, we set it so that it was stationary for 12 hours at 4°C and stabilized the bonding. Then, we added a 2 mL PBS solution (hereinafter abbreviated to “SM/PBS”) which contained 1 % skim milk, 0.1 % sodium azide and 2 mM EDTA to the antibody bonding beads to carry out blocking of the excess bonding sites on the surface of the beads. We kept this stationary as is for 12 hours and stabilized the blocking process. Then, we washed the beads twice with PBS, diluted it 20 times in the SM/PBS solution and kept it in a liquid state at 4°C until used.

We produced a 6 mg/mL solution of the 12-1 antibody refined product in the final concentration. We added approximately 2 mg of ruthenium (produced by Eigen Ltd.) in 1 mL of this antibody solution and kept it stationary for 2 hours at room temperature. Then, we added 0.2 M of glycine/PBS (pH 7.8) and blocked the excess reaction sites. We placed the ruthenium marker antibody solution on an Ultro-gel AcA44 gel chromatography [device], eluted it using PBS containing 0.1 % sodium azide and isolated the antibodies which had been labeled which had been eluted first of all. The ruthenium marker 12-1 monoclonal antibodies which were produced in this way were stored as is at 4°C until used.

We mixed equivalent weights of chicken blood serum (from JRH Bioscience Ltd.) and SM/PBS and used them as an LN5 standard product diluent and a labeled antibody diluent (hereinafter abbreviated to “diluent”). We used refined LN5 derived from MKN45 cells obtained in the aforementioned Practical Embodiment 1 as a standard product, diluted with the diluent until the LN5 concentration was 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ng/mL and produced the standard product solution. We also diluted each of the ruthenium labeled antibodies 100 times using the diluent. We assayed the biological samples using an automatic measuring apparatus (Bicoline 8220, manufactured by Sanko Junyaku Ltd.). We collected 0.2 mL respectively of the standard product and the human serum and plasma specimens, added these to a special reaction tube and set this on a special reaction tube rack. The step involving automatic assay is as follows. First, we added 0.025 mL of the antibody bonding beads to the reaction tube

and carried out a reaction with the first antibodies while stirring intermittently for approximately 9 minutes. After we suctioned the liquid from inside of the reaction tube and removed it, we washed it twice using a wash. After washing it, we added 0.2 mL of a ruthenium labeled antibody solution and carried out the reaction with the second antibody while stirring intermittently for approximately 9 minutes. After we suctioned the liquid from inside of the reaction tube and removed it, we washed it twice using a wash. We added 0.3 mL of an “issuing” [translator’s note: this is most likely a typo for “luminescent” as the word “luminescent” is used in the same sentence in its correct spelling] electrolysis solution and measured the luminescent amount.

We made a calibration line using the standard antigen which was assayed simultaneously and calculated the concentration of the antigen. We used the luminescent count of only the diluent as a blank value. We were able to assay satisfactorily between antigen concentrations of 1000 to 15.627 ng/mL (Figure 7).

#### **[Practical Embodiment 4] LN5 Antigen in Nude Mouse Serum with Grafted Human Cancer**

##### **(1) Orthotopic Graft of Human Pancreatic Cancer Cells to Nude Mouse**

We cultured three types of human pancreatic cancer cell strains (HPAC, MIAapa-II and KP-1) respectively in a RPMI-1640 culture medium with 10 % fetal calf serum added in a culture flask and recovered only the cells by trypsin-EDTA solution processing at stages where these had fully developed. We washed the respective cells thoroughly and carried out an orthotopic graft to the pancreas of an 8-week old nude mouse (procured from Nippon Charles River Ltd.) under anesthesia. The mice to which the cells had been grafted were raised inside a clean room. We randomly selected 3 animals each in the second week, the third week, the fourth week and the fifth week after grafting and collected blood from the heart while the animals were under anesthesia. After all of the blood collected had been set aside overnight so that it was stationary at 4°C, we separated only the blood serum by centrifuging. We kept the blood serum centrifuged under cold storage until it was to be assayed. We also carried out necropsies of the mice after collecting blood and extracted the primary pancreatic tumor parts and measured the weight.

##### **(2) Assaying LN5 Decomposition Product in Mouse Serum**

We assayed the LN5 antigen in the mouse serum which had been collected as indicated in the previous section by using the assay method indicated in Practical Embodiment 3 (3). It was found from the assay results that the LN5 antigen which was derived from the grafted cells had clearly disengaged to the blood of the nude mouse to which the HPAC cells had been grafted. We also confirmed that the concentration in the blood had increased in correlation to the increase in the primary tumor nidus (Figure 8).

It was also confirmed that the primary tumor nidus had grown in the nude mice to which MIAaca-II cells without the LN5 antigen producing capability had been grafted, however, no increase whatsoever in the concentration in the blood of the LN5 antigen was detected (Figure 9).

It was further confirmed from the experimental results in Practical Embodiment 2 that the KP-1 cells had a capacity for secreting the  $\alpha$  3 chain and the  $\beta$  3 chain. Although it was assumed that it did not produce the LN5 antigen, in this study, we detected an increase in the concentration of the LN5 antigen which was correlated to the increase in the primary tumor nidus in the blood of the nude mouse to which KP-1 had been grafted (Figure 10). On the basis of this, it was indicated that the KP-1 cells are cells which have properties such that they can produce the LN5  $\gamma$  2 chain monomers. It is indicated that assaying the LN5 antigens using this method is useful for detecting  $\gamma$  2 chain monomer producing cancers.

These results indicated that it was possible to monitor the production of LN5 antigens of various types in the primary tumor nidus using this method of assay.

#### **[Practical Embodiment 5] Concentration of LN5 Antigen in Blood of Patients with ARDS (Acute Respiratory Stress Syndrome)**

Since LN5 is contained in large quantities in the *in vivo* organs and particularly in the epithelial tissue, we believe that *in vivo* metabolizing of LN5 possibly increases in patients with pulmonary infectious diseases. We measured the concentration of the LN5 antigen in the blood plasma specimens which were collected from healthy persons and from ARDS patients using the method indicated in Practical Embodiment 3 (3).

The LN5 antigen concentration in the blood plasma of 15 healthy persons, 19 ARDS patients who survived and 8 ARDS patients who died is indicated in Figure 11. The concentration of the LN5 antigen in the blood plasma was respectively 60.8 ng/mL, 158 ng/mL and 250.9 ng/mL and it was clear that the concentration in the blood clearly increased for the ARDS patients. Based on this, it was confirmed that the LN5 antigens could become markers in the blood for use as a new way of diagnosing ARDS and in determining the gravity of the disease.

#### **[Practical Embodiment 6] Concentration of LN5 Antigen in Blood of Patients with A Variety of Digestive Organ Group Cancers**

It is believed that LN5 is produced in large amounts from epithelial group malignant tumor cells. We measured the concentration of LN5 antibodies in blood serum samples collected from 31 patients with digestive organ group benign diseases (8 patients with diabetes and 25 patients with chronic pancreatitis), 9 patients with mucous producing pancreatic tumors and 155 patients with digestive organ group malignant tumors (36 patients with pancreatic cancer, 18 patients with cancer of the pancreas (metastasis to liver), 10 patients with stomach cancer, 16 patients with cancer of the gall bladder and the bile duct and 75 patients with liver cancer using the assay method indicated in Practical Embodiment 3 (3).

The concentration of the LN5 antigen in the blood serum of 8 patients with diabetes, 25 patients with chronic pancreatitis, 9 patients with mucous producing pancreatic tumors, 36 patients with pancreatic cancer, 18 patients with pancreatic cancer (with metastasis to the liver), 10 patients with stomach cancer, 16 patients with cancer of the gall bladder and the bile duct and 75 patients with liver cancer is indicated in Figure 12. The concentration of the LN5 antigen in the blood serum was the mean value for the respective groups—54.2 ng/mL, 50.6 ng/mL,

35.0 ng/mL, 68.3 ng/mL, 165.9 ng/mL, 111.0 ng/mL, 136.0 ng/mL and 121.9 ng/mL—which clearly indicates that the concentration in the blood in each of the groups with different digestive organ group cancers increased. A tendency for the concentration to rise in patients with cancer metastasis to the liver was detected. Based on this, it was confirmed that the LN5 antigen could become a marker in the blood for use in evaluating the malignancy of digestive organ group malignant tumors.

### **Potential Industrial Use of the Invention**

The present invention provides an assay sample and an assay method for LN5 antigen in biological samples. Using this, it was possible to detect the cancer cells which produce LN5, to examine the acute respiratory distress syndrome and to evaluate the malignancy of malignant tumors.

### **Scope of Patent Claim**

1. A method for assaying laminin 5 antigens in biological samples which is comprised of (a) a step of bringing the biological sample into contact with an antibody reactive with a laminin 5  $\gamma$  2 chain N terminal fragment; (b) a step of measuring the reaction of the antibody; and (c) a step of qualifying the laminin 5 antigen based on the results of the measurement of the reaction as described above;
2. The composition of Claim 1 wherein the antibodies are monoclonal antibodies which are produced from cells which are deposited using deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-3134;
3. An assay reagent of the laminin 5 antigens in biological samples which contain antibodies which are reactive to the laminin 5  $\gamma$  2 chain N terminal fragments;
4. The composition of Claim 3 wherein the antibodies are monoclonal antibodies which are produced from cells which are deposited using deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134;
5. Monoclonal antibodies which are produced by cells deposited with deposit numbers FERM BP-8136, FERM BP-8133 or FERM BP-8134;
6. A method for detecting cancer cells which comprises (a) a step which assays the laminin 5 antigens in biological samples by using the method indicated in Claim 1 or Claim 2 above; and (b) a step which detects cancer cells which produce laminin 5 based on the assay results of the laminin antigens as indicated above;
7. A test reagent which is used to detect cancer cells which produce laminin 5 which contains the assay reagent indicated in Claim 3 or Claim 4 above;
8. A method for examining the acute respiratory distress syndrome which comprises (a) a step for assay of the laminin 5 antigens in the biological samples by using the method indicated in

Claim 1 or Claim 2 above; and (b) a step for examining acute respiratory distress based on the results of assaying the aforementioned laminin 5 antigens;

9. A test reagent used for testing acute respiratory distress syndrome which contains the assay reagent indicated in Claim 3 or Claim 4 above;

10. A method for evaluating the malignancy of a malignant tumor which comprises (a) a step which assays the laminin 5 antigens in biological samples by using the method indicated in Claim 1 or Claim 2 above; and (b) a step which evaluates the malignancy of malignant tumors based on the assay results of the aforementioned laminin 5 antigens;

11. A test reagent used for evaluating the malignancy of malignant tumors which contains the assay reagent indicated in Claim 3 or Claim 4 above;

12. A method for measuring the manifestation of the beta 4 integrin which comprises (a) a step which brings the supernatant of a cell culture into contact with an antibody which is reactive to laminin 5; (b) a step which measures the reaction of the aforementioned antibody; and (c) a step of qualifying the  $\beta$  4 integrin of the aforementioned cells based on the results of assaying the reaction as indicated above.

Figure 1

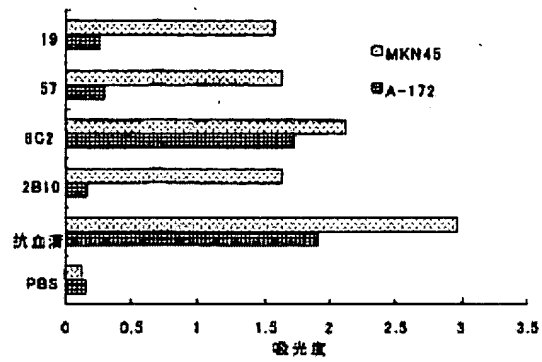


図 1

[captions: left hand margin: Antiserum  
beneath figure: Absorbance

Figure 2

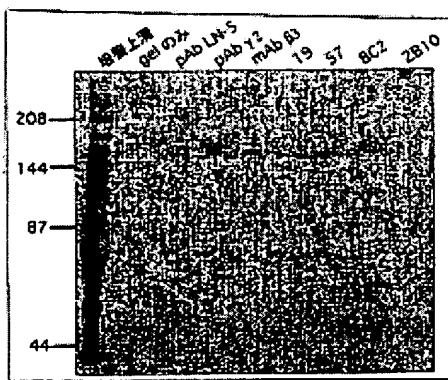


図 2

[caption: upper left hand corner: culture supernatant; gel only

Figure 3

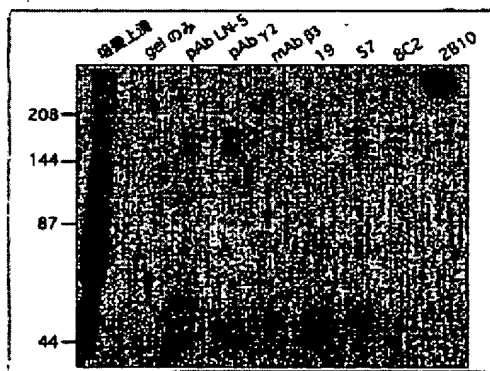


図 3

[caption: upper left hand corner: culture supernatant; gel only

**Figure 4**  
**Concentration of LN5 in Culture Supernatant (ng/mL)**

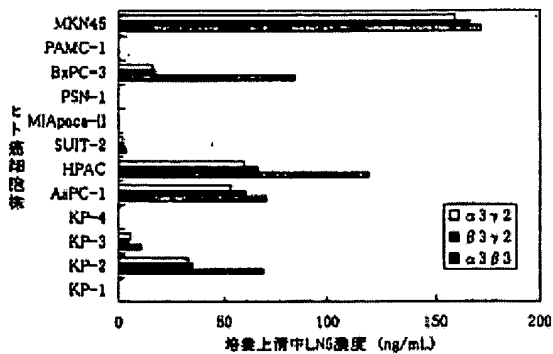


図 4

[caption: left hand margin: Human cancer cell strain]

**Figure 5**

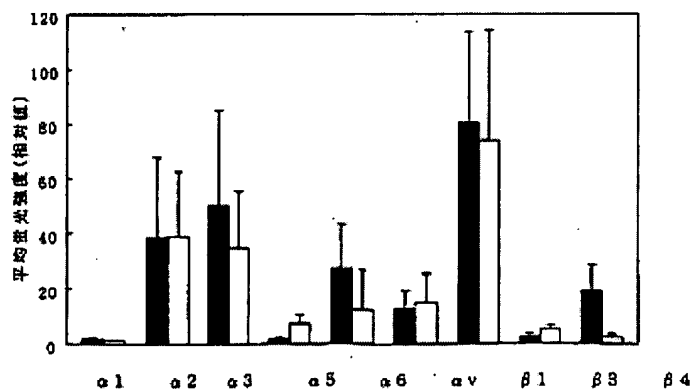


図 5

[caption: left hand margin: mean fluorescent strength (relative value)]

**Figure 6**



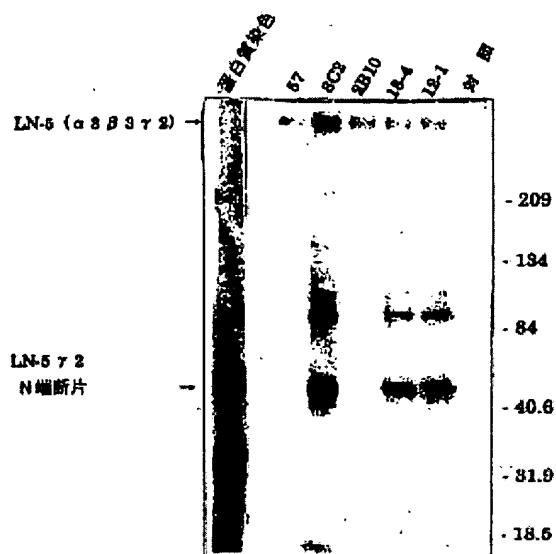


図 6

[captions: upper left hand corner: protein staining  
upper right hand corner: control  
left hand margin: LN-5  $\gamma$  2 N terminal fragment

Figure 7

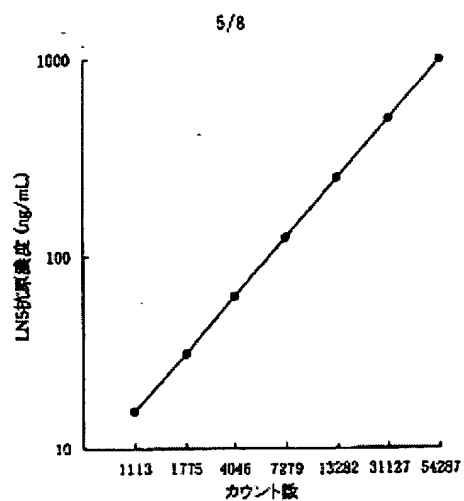


図 7

[captions: left hand margin: LN5 antigen concentration (ng/mL)  
beneath figure: number of counts

Figure 8

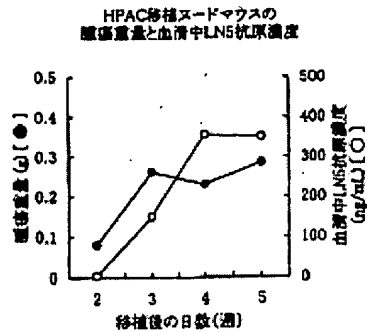


図 8

[captions: left hand margin: tumor weight (g) [●]  
top of figure: Tumor weight and concentration of LN5 antigen in blood serum for nude mouse  
with HPAC graft  
right hand margin: Concentration of LN5 antigen in blood serum [○]  
beneath figure: Number of days (weeks) after graft

Figure 9

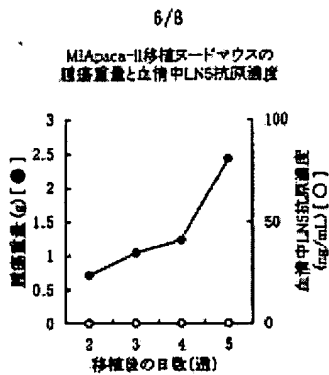


図 9

[captions: left hand margin: tumor weight (g) [●]  
top of figure: Tumor weight and concentration of LN5 antigen in blood serum for nude mouse  
with MIApaca-II graft  
right hand margin: Concentration of LN5 in blood serum [○]  
beneath figure: Number of days (weeks) after graft

Figure 10

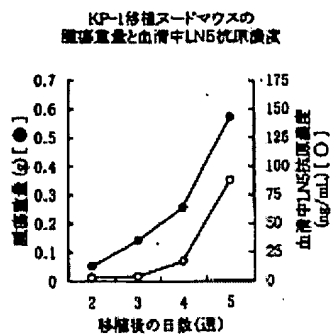


図 1 0

[captions:left hand margin: tumor weight (g) [●]  
top of figure: Tumor weight and concentration of LN5 antigen in blood serum for nude mouse  
with KP-I graft  
right hand margin: Concentration of LN5 antigen in blood serum (ng/mL) [O]  
beneath figure: Number of days (weeks) after graft

Figure 11

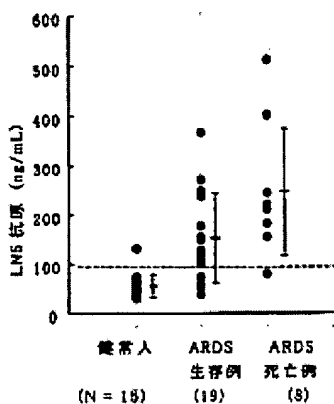


図 1 1

[captions:left hand margin: LN5 antigen (ng/mL)  
beneath figure, left to right:  
Healthy person (N = 15)  
Patients with ARDS who survived (19)  
Patients with ARDS who died (8)

Figure 12

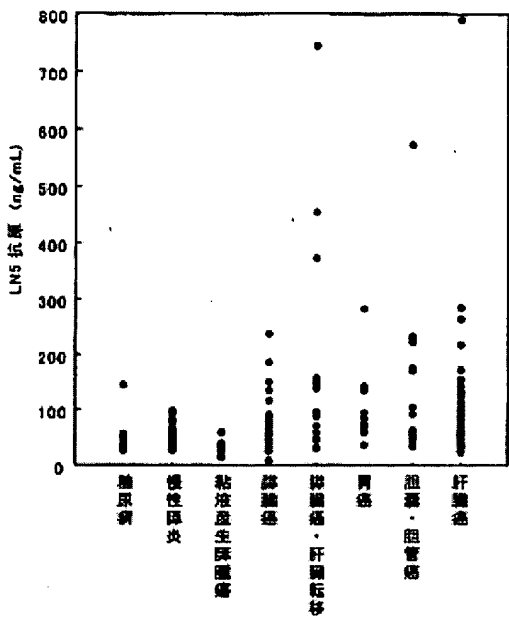


图 1 2

[captions: left hand margin: LN5 antigen (ng/mL)

beneath figure, left to right

- Diabetes
- chronic pancreatitis
- mucous producing pancreatic tumor
- pancreatic cancer
- pancreatic cancer, metastasis to liver
- stomach cancer
- gall bladder cancer, bile duct cancer
- liver cancer

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 2 月 27 日 (27.02.2003)

PCT

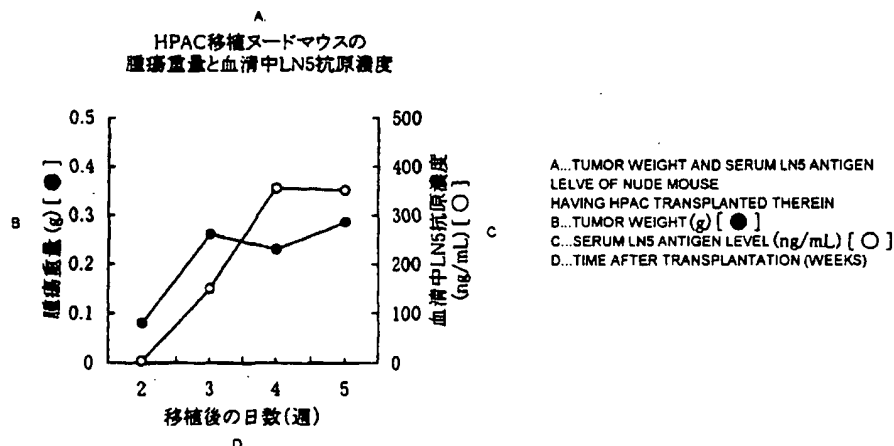
(10) 国際公開番号  
WO 03/016907 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08347
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 19 日 (19.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-247685 2001 年 8 月 17 日 (17.08.2001) JP  
特願2002-31181 2002 年 2 月 7 日 (07.02.2002) JP  
特願2002-106468 2002 年 4 月 9 日 (09.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO. LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片山 政彦 (KATAYAMA, Masahiko) [JP/JP]; 〒305-0041 茨城県
- (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許

[続葉有]

(54) Title: REAGENT FOR ASSAYING LAMININ 5 ANTIGEN IN BIOLOGICAL SAMPLE AND ASSAY METHOD

(54) 発明の名称: 生体試料中のラミニン 5 抗原の測定試薬及び測定方法



(57) Abstract: A method of assaying a laminin 5 antigen in a biological sample which involves the step of bringing the biological sample into contact with an antibody reactive with a laminin 5  $\gamma$  2 chain fragment, the step of measuring the reaction of the antibody, and the step of qualifying the laminin 5 antigen based on the results of the measurement of the reaction as described above; and a method of detecting laminin 5-producing cancer cell, a method of examining acute respiratory distress syndrome and a method of evaluating the malignancy of a malignant tumor each using the above assay method.

[続葉有]



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ  
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

---

(57) 要約:

ラミニン5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体と生体試料とを接触させる工  
程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいてラミ  
ニン5抗原の量を決定する工程を含んでなる、生体試料中のラミニン5抗原を測  
定する方法、ならびに、この方法を利用したラミニン5を産生する癌細胞の検出  
法、急性呼吸窮迫症候群の検査法及び悪性腫瘍の悪性度の判定法。

## 明細書

## 生体試料中のラミニン5抗原の測定試薬及び測定方法

## 技術分野

本発明は、生体試料中のラミニン5抗原の測定方法及び測定試薬に関する。

## 背景技術

基底膜はコラーゲンを中心とする細胞外マトリックス成分により構成されており、生体内に普遍的に存在する。基底膜を構成する高分子タンパク質としてラミニン（以下、LNと略記することがある）がある。LNはその構造によって十数種に分類されており、それぞれ機能と局在組織が異なっており、例えばLN1やLN2の様に末尾に番号をつけて分類されている。いずれのLNも異なるアミノ酸配列を持つポリペプチド鎖3本が複合体を形成することにより成り立っており、電子顕微鏡下の観察では十字架様の分子形態を呈する。その3本のポリペプチド鎖はそれぞれ $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖と呼ばれており、それぞれの鎖に数種の分子種（ $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 、 $\beta 1 \sim \beta 3$ 、 $\gamma 1$ 及び $\gamma 2$ ）が存在する。

上皮細胞と上皮細胞を裏打ちしている結合組織との間に存在する基底膜には、上皮細胞特有の細胞接着構造が存在しており、その中に主として存在する細胞外マトリックス構成タンパク質としてラミニン5（以下、LN5と略記することがある）が知られている。LN5の生理学的な特徴は、上記のLN群の中で唯一上皮細胞のみから産生され、上皮細胞の基底膜への接着や運動機能を促進する活性を有することである。上皮細胞は自身の細胞膜上のインテグリンと呼ばれる特定のレセプターを介して、LN5およびLN5を含む基底膜に強固に接着し、また激しく遊走する現象が知られている。

このLN5は $\alpha 3$ 鎖、 $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖のそれぞれ1本ずつが複合体を形成したものである。特に $\gamma 2$ 鎖はLN5固有と考えられており、他のLN分子種には含まれていない [Dev. Dyn., 218, 213-234 (2000)]。また、LN5は上皮細胞から分泌される際に蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）により一部の領域で分解を受けることがわかつ

ており、特に $\gamma$ 2鎖のN末端部が切断されることにより、N末端部が遊離した残りのLN5分子本体はその細胞運動促進活性が増大することが示されている [J. Cell Biol., 148, 615-624 (2000)]。

すなわち、上皮細胞等から遊離するLN5 $\gamma$ 2鎖断片の量は、その細胞におけるLN5産生量を反映しており、また、上皮組織でのLN5による上皮細胞の運動促進活性を測定する指標となりうると考えられる。

最近、上皮細胞由来の悪性腫瘍組織でLN5の発現が増大しているという研究結果が多数報告された。特に、LN5の発現度が悪性腫瘍の浸潤性と良く相関したという報告が多く、癌の体外診断を目的として病態マーカーとしての利用が可能ではないかと考えられている [J. Natl. Cancer Inst., 91, 1882-1887(1999), およびCancer, 85, 2315-2321 (1999)]。

しかし、これらの研究では、患者の体内から手術等により病理組織を摘出し切片としてから、目的のタンパク質の発現部位を抗体により免疫染色する方法が主に用いられており、実際に医療現場での体外診断に応用していく上では、定量性や汎用性に欠けているとともに、外科的手術や組織生検など患者への肉体的負担が問題となっている。このことから、比較的安全に採取できる血液などの生体試料中のLN5抗原の量を測定する簡便で迅速な測定方法の確立が望まれている。

最近、LN5に対する2種のモノクローナル抗体 ( $\alpha$ 3鎖に対するモノクローナル抗体BM165と $\beta$ 3鎖に対するモノクローナル抗体6F12) を用いた酵素免疫学的測定法 (ELISA) が報告された [J. Immunol. Meth., 224, 161-169(1999)]。しかし、この報告では、ELISAによって生体試料中のLN5抗原を検出した例が示されていない。

## 発明の開示

本発明の課題は、LN5に対して特異的に結合する抗体を用いて、微量の生体試料中から、精度良く簡便にその中に含有されるLN5抗原を定量する方法を提供することにある。

本発明者らは、生体試料中のLN5抗原の定量方法に関して、様々な検討をする過程において、LN5 $\gamma$ 2鎖の分解に着目した。そして、本発明者らはLN5の各鎖を



認識するモノクローナル抗体を作製し、上皮系癌細胞培養上清中のLN5抗原を免疫学的に解析した。その結果、多くの上皮系癌細胞はその培養上清中に $\gamma$ 2鎖が切断されたLN5を分泌することが判明した。また、作製した $\gamma$ 2鎖に対するモノクローナル抗体が、LN5のプロテアーゼ分解の結果遊離する $\gamma$ 2鎖断片に反応していることを確認した。

さらに解析を進めて、その遊離する $\gamma$ 2鎖断片に対して反応性を有するモノクローナル抗体を複数種類作製し、 $\gamma$ 2鎖断片に対して反応性を有する2種の異なるモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ方式の免疫学的測定試薬を作製した。また、このLN5 $\gamma$ 2鎖断片に対して反応性を有する2種のモノクローナル抗体を用いた測定試薬により血清及び血漿中のLN5抗原を効率よく測定することができることを見出した。

前述の様に、 $\gamma$ 2鎖はLN5固有の構成因子であり他のLN分子種には含まれていない。すなわち、 $\gamma$ 2鎖断片に対する抗体を用いる測定試薬は、生体試料中の $\gamma$ 2鎖断片、または非断片化 $\gamma$ 2鎖、または $\beta$ 3鎖 $\gamma$ 2鎖複合体、または $\alpha$ 3鎖 $\beta$ 3鎖 $\gamma$ 2鎖複合体のいずれの分子も測定することが可能となり、生体試料中のほとんどのLN5抗原を測定し、上皮組織におけるLN5の産生量を反映する病態把握上の有用な指標になると考えられる。

また、生体試料中のLN5抗原の増加はどのような生体内現象を反映しているのかについても実験的検討を加えた。ヒト膵臓癌細胞株11種について、10%牛胎児血清存在下液体培地中で一定期間培養し、その培養上清中のLN5抗原の濃度と発現している接着分子レセプターである各種インテグリンの発現量を比較した。LN5産生株6種では、LN5非産生株5種に比較して明らかに $\beta$ 4インテグリンの発現量が高い傾向があった。すなわち、生体内におけるLN5抗原の産生量は生体内上皮組織での $\beta$ 4インテグリン発現量の指標となりうることを実験的に示された。

さらに、LN5を産生するヒト腫瘍をヌードマウスに移植し、腫瘍の増殖と血清中のLN5の濃度が相関することを見出し、血清中のLN5を測定することにより、LN5を産生する腫瘍の増殖をモニター出来ることを明らかにした。

加えて、LN5が生体内臓器の中でも特に肺上皮組織に多く含まれていることから、肺の炎症性疾患において生体内のLN5代謝が高まるのではないかという仮説

を立てた。その仮説の元に、急性呼吸窮迫症候群（Acute Respiratory Distress Syndrome、以下ARDSと称す）患者から採取した血漿検体と健常人から採取した血漿検体中のLN5抗原濃度を上記方法にて測定した。健常人群に比較して、急性呼吸窮迫症候群患者群は明らかに高い血中濃度を示し、本疾患の臨床診断に極めて有用であることを見出した。

以上の知見に基づき本発明は完成された。すなわち本発明は、以下のものを提供する。

1. ラミニン5  $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体と生体試料とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいてラミニン5抗原の量を決定する工程を含んでなる、生体試料中のラミニン5抗原を測定する方法。
2. 抗体が、FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体である、1に記載の方法。
3. ラミニン5  $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体を含有してなる、生体試料中のラミニン5抗原の測定試薬。
4. 抗体が、FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体である、3に記載のラミニン5抗原の測定試薬。
5. FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体。
6. 1又は2に記載の方法により生体試料中のラミニン5抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン5抗原の測定結果に基づいてラミニン5を産生する癌細胞を検出する工程を含んでなる、ラミニン5を産生する癌細胞を検出する方法。
7. 3又は4に記載の測定試薬を含んでなる、ラミニン5を産生する癌細胞の検出用の検査試薬。
8. 1又は2に記載の方法により生体試料中のラミニン5抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン5抗原の測定結果に基づいて急性呼吸窮迫症候群を検査する工程を含んでなる、急性呼吸窮迫症候群を検査する方法。
9. 3又は4に記載の測定試薬を含んでなる、急性呼吸窮迫症候群の検査用の検

査試薬。

10. 1又は2に記載の方法により生体試料中のラミニン5抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン5抗原の測定結果に基づいて悪性腫瘍の悪性度を判定する工程を含んでなる、悪性腫瘍の悪性度を判定する方法。

11. 3又は4に記載の測定試薬を含んでなる、悪性腫瘍の悪性度の判定用の検査試薬。

12. ラミニン5に反応性を有する抗体と、細胞の培養上清とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいて前記細胞の $\beta$ 4インテグリンの発現量を決定する工程を含んでなる、 $\beta$ 4インテグリン発現を測定する方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、MKN45細胞およびA-172細胞の培養液由来のLN5に対する各モノクローナル抗体（19、57、2B10、8C2）の反応性を示したグラフである。「抗血清」は抗ヒトLN5マウスポリクローナル抗体の反応を示す。「PBS」は抗体を添加しない時の反応を示す。グラフ横軸はELISAでの吸光度値を示す。

図2は、HT-1080細胞培養液中のLN5抗原の各抗体による免疫沈降実験の結果を示す。左の数値は分子量マーカーの泳動位置である（kDa）。「培養上清」は総タンパク質の泳動像である。「gelのみ」は免疫沈降に使用したゲルからのタンパク質の泳動像である。「pAb LN-5」はヒトLN5に対するポリクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。「pAb  $\gamma$ 2」はヒトLN5  $\gamma$ 2鎖に対するポリクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。「mAb  $\beta$ 3」はヒトLN5  $\beta$ 3鎖に対するモノクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。

図3は、A-431細胞培養液中のLN5抗原の各抗体による免疫沈降実験の結果を示す。左の数値は分子量マーカーの泳動位置である（kDa）。「培養上清」は総タンパク質の泳動像である。「gelのみ」は免疫沈降に使用したゲルからのタンパク質の泳動像である。「pAb LN-5」はヒトLN5に対するポリクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。「pAb  $\gamma$ 2」はヒトLN5  $\gamma$ 2鎖に対するポリクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。「mAb  $\beta$ 3」はヒトLN

5 $\beta$ 3鎖に対するモノクローナル抗体による免疫沈降タンパク質の泳動像である。

図4は、11種のヒト膵臓癌細胞株およびMKN45ヒト胃癌細胞株の培養上清中のLN5濃度測定の結果を示す。「 $\alpha$ 3 $\gamma$ 2」は、8C3（抗 $\gamma$ 2モノクローナル抗体）固相化プレートと酵素標識2B10（抗 $\alpha$ 3鎖モノクローナル抗体）との組み合わせによるELISAでの測定値を示す。「 $\beta$ 3 $\gamma$ 2」は、8C3（抗 $\gamma$ 2モノクローナル抗体）固相化プレートと酵素標識57（抗 $\beta$ 3鎖モノクローナル抗体）との組み合わせによるELISAでの測定値を示す。「 $\alpha$ 3 $\beta$ 3」は、57（抗 $\beta$ 3モノクローナル抗体）固相化プレートと酵素標識2B10（抗 $\alpha$ 3鎖モノクローナル抗体）との組み合わせによるELISAでの測定値を示す。

図5は、11種のヒト膵臓癌細胞株の各インテグリン分子の発現量を比較した結果を示す。LN5産生株（KP-2、KP-3、AsPC-1、HPAC、SUIT-2、BxPC-3）での各インテグリン発現量の平均値と標準偏差、およびLN5非産生株（KP-1、KP-4、MIA paca-II、PSN-1、PANC-1）での各インテグリン発現量の平均値と標準偏差を示す。

図6は、BxPC-3細胞培養液中のLN5抗原の各モノクローナル抗体によるウェスタンブロット実験の結果を示す。右の数値は分子量マーカの泳動位置である（kDa）。「57」は57モノクローナル抗体による反応抗原、「8C2」は8C2モノクローナル抗体による反応抗原、「2B10」は2B10モノクローナル抗体による反応抗原、「18-4」はKP2-LN5-8C2E 18-4モノクローナル抗体による反応抗原、「12-1」はKP2-LN5-8C2E 12-1モノクローナル抗体による反応抗原、「対照」はコントロール抗体による反応抗原を示す。8C2、KP2-LN5-8C2E 12-1、KP2-LN5-8C2E 18-4の3種は明らかに分子量約5万の断片に反応している。

図7は、KP2-LN5-8C2E 18-4モノクローナル抗体固相化ビーズとルテニウム標識KP2-LN5-8C2E 12-1モノクローナル抗体を用いた電気化学発光免疫測定での検量線を示す。

図8は、HPAC細胞を移植したヌードマウスの移植後2、3、4、および5週間目の原発腫瘍重量（●）と血清中LN5抗原濃度（○）の変化。

図9は、MIApaca-II細胞を移植したヌードマウスの移植後2、3、4、および5週間目の原発腫瘍重量（●）と血清中LN5抗原濃度（○）の変化。

図10は、KP-1細胞を移植したヌードマウスの移植後2、3、4、および5週

間目の原発腫瘍重量（●）と血清中LN5抗原濃度（○）の変化。

図11は、27例のARDS患者および15例の健常人の血漿中LN5抗原濃度の分布、平均値、及び標準偏差を示す。ARDSは、生存例19例（軽症例）と死亡例8例（重症例）に分けた。

図12は、消化器系良性疾患患者31例、粘液産生脾腫瘍患者9例、および消化器系悪性腫瘍患者155例の血清中LN5抗原濃度の分布を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書におけるLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片とは、 $\gamma$ 2鎖が分解されて生じる断片のうちのN末端側の断片を意味する。N端断片は、通常には、生体試料中に遊離し得る断片、すなわち、液体試料である生体試料に、又は、生体試料から調製される液体画分に存在し得る断片である。このようなN端断片の例としては、 $\gamma$ 2鎖のドメインIV及びVを含む、分子量約5万の断片が挙げられる。

本明細書におけるLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体とは、LN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に対して免疫化学的に結合する抗体、すなわち、抗原抗体反応を示す抗体を意味する。

本明細書における生体試料とは、血清、血漿、髄液、腹水、尿、涙液、汗、唾液といった体液、排泄物や組織抽出物などであり、医療機関等において通常採取されるものであれば特に限定されるものではないが、被験者からの血清及び血漿などの血液検体が特に好適である。

本明細書におけるLN5抗原とは、LN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体が免疫化学的に反応する抗原であり、LN5 $\gamma$ 2鎖及びそのN端断片ならびに $\gamma$ 2鎖を含む複合体が包含される。

本発明の、生体試料中のLN5抗原を測定する方法における、LN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体と生体試料とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいてLN5抗原の量を決定する工程は、抗体として、LN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体を用いる他は、通常の免疫化学的方法による抗原の測定方法と同様でよい。

本発明の測定方法においては、分解して体液中に分泌され、生体試料からも測

定可能なLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片を、このLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体、さらに好ましくはFERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体を用いて免疫化学的方法により測定することが好ましい。

免疫化学的方法としては、ラテックス凝集法、競合法、サンドイッチ法等などがあるが特に限定されるものではない。競合法、サンドイッチ法では、それぞれLN5抗原あるいは抗体を放射性標識、酵素標識、電気化学発光（ECL）標識または蛍光標識等の標識物質により標識し、標識に適した方法により検出する。好ましくは酵素標識、電気化学発光標識した抗体を用いたサンドイッチ法、さらに好ましくは電気化学発光標識した抗体を用いたサンドイッチ法が適している。

本発明の測定試薬は、本発明の測定方法に用いる測定試薬であり、少なくともLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体、さらに好ましくはFERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体を含み、場合によっては、LN5の標準抗原、標識の種類に応じた該標識の検出試薬、例えば酵素標識であれば酵素の基質を含んでいても良い。また、測定試薬中に適当なバッファーを含むことも許される。抗体に、測定試薬に用いるのに許容可能な担体や標識を結合させて、固定化抗体や標識抗体としてもよい。本発明の測定試薬は、抗体を含む試薬の製造に通常に用いられる技術を選択して用いることにより製造することができる。測定試薬が複数の構成成分からなる場合には、キットとされていてもよい。

LN5 $\gamma$ 2N端断片に反応性を有する抗体は、精製LN5 $\gamma$ 2鎖断片を実験動物に免疫感作して得られる抗血清由来のポリクローナル抗体などLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に対して結合性を有するものであれば特に限定されるものではないが、反応特異性に優れており製造のコストも低いことからマウスモノクローナル抗体が最適である。

モノクローナル抗体の作製法を以下に述べる。ヒトLN5は既に報告されている方法に従って精製することができる [Int. J. Cancer, 76, 63-72 (1998)]。精製LN5または精製LN5 $\gamma$ 2鎖断片を免疫用抗原として生理食塩水などに溶解し、適当なアジュバントとともに実験動物体内へ投与する。実験動物としては業者から入手されるものが挙げられ、特に限定されないが、特にBalb/Cマウスがよく用い

られる。その抗原の投与を数週間間隔で数回繰り返す。最後の投与が終了した3日後にその免疫動物から脾臓を摘出する。摘出した脾臓細胞を単細胞に分散させ、あらかじめ培養しておいたマウスミエローマ細胞とポリエチレングリコール試薬の存在下に細胞融合する。細胞融合した後に薬剤により選択培養を行い、LN5 $\gamma$ 2鎖N端断片に反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のみを選別する。その後、抗体産生細胞は数回のクローニング操作により完全なモノクローナル抗体産生細胞として樹立される。モノクローナル抗体の特異性は、例えば、免疫に使用した精製抗原を電気泳動により分離しウエスタンブロット解析等を行うことにより確認することができる[Antibodies: a Laboratory Manual, by Ed Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbar Laboratory Press (1988)]。

またモノクローナル抗体としては、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに、FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞が産生する抗体を使用することができる。

以下にECL法について説明する。生体試料中のLN5抗原のECL測定においては、その測定方式としても様々なものが知られているが、特に簡便で定量性が高いものとして第1抗体固相化磁気ビーズとルテニウム錯体によって標識した第2抗体を同時に用いたサンドイッチ方式が好ましい。この場合の第1抗体と第2抗体はLN5 $\gamma$ 2鎖断片に対して特異的に反応するものの、それぞれ異なる抗原決定基に結合することが望ましい。

標準抗原は、ヒト癌細胞株、例えばヒト癌細胞株の培養上清より精製して、吸光度分析等によりタンパク質濃度を決定し調製することができ、使用時に希釈液にて適度な濃度に希釈して使用することができる。

以下に測定手順の一例について説明するが、本発明はこの例に限定されるものではない。

LN5 $\gamma$ 2鎖断片抗体（第1抗体）を市販磁気ビーズに固相化させる。固相化は共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。次に、他の分子の磁気ビーズへの非特異結合を低減するためにミルクカゼインなどのブロッキングタンパク質を吸着させる。

そこへあらかじめ濃度の明らかな標準LN5抗原溶液、または被験生体試料を加

えて一定時間攪拌する。試料中のLN5抗原を抗体結合粒子表面に吸着させた後に粒子を洗浄し、今度はルテニウム等の化学発光性錯体にて標識した別の抗LN5 $\gamma$ 2鎖断片抗体（第2抗体）を適当な濃度で加える。一定時間まで攪拌して第1抗体とLN5抗原と第2抗体の3者の複合体を磁気ビーズ上に形成させる。

その後にビーズを洗浄して、専用の装置中の電極間にて電流を通し標識物である錯体を発光させ、発光強度を計測する。この際にルテニウム標識物の量に対応して発光量が得られる。被験生体試料の発光量と標準品の発光量を検量線等を用いて比較することにより精度良く被験生体試料中のLN5抗原の量を知ることができる。

本発明の、LN5を産生する癌細胞の検出方法、急性呼吸窮迫症候群の検査方法、及び、悪性腫瘍の悪性度の判定方法は、生体試料中のLN5抗原を測定し、その測定結果に基づいて検出、検査及び判定を行うことを特徴とする。

生体試料中のLN5抗原の測定は、本発明の測定方法により行われる。LN5抗原の測定結果を指標として用いることにより、LN5を産生する癌細胞が検出され、急性呼吸窮迫症候群が検査され、または、悪性腫瘍の悪性度が判定される。例えば、LN5抗原の定量値が、正常値よりも高い場合に、LN5を産生する癌細胞が検出されたとすること、急性呼吸窮迫症候群が検出されたとすること、または、悪性腫瘍の悪性度が高いと判定することができる。

本発明の測定試薬は、LN5を産生する癌細胞の検出、急性呼吸窮迫症候群の検査、及び、悪性腫瘍の悪性度の判定の用途に用いることができる。

本発明は、また、細胞の $\beta$ 4インテグリン発現を測定する方法を提供する。この方法は、LN5に反応性を有する抗体と、細胞の培養上清とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいて前記細胞の $\beta$ 4インテグリンの発現量を決定する工程を含んでなる。

LN5に反応性を有する抗体と、細胞の培養上清とを接触させる工程、及び、前記抗体の反応を測定する工程は、LN5に反応性を有する抗体を用いる他は、通常の免疫化学的方法による抗原の測定方法と同様でよい。免疫化学的方法は、本発明の測定方法に関して上記に説明したのと同様でよい。

LN5に反応性を有する抗体は、好ましくはモノクローナル抗体であり、このよ



ようなモノクローナル抗体としては、FERM BP-8133、FERM BP-8134、FERM BP-8135、FERM BP-8136、FERM BP-8137またはFERM BP-8140の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体が挙げられる。

LN5に反応性を有する抗体の反応の測定結果は培養上清中へのLN5産生量を反映しており、これを指標として用いることにより、 $\beta$ 4インテグリンの発現量が決定される。

### 実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

#### [実施例1] LN5に対するモノクローナル抗体の作製

ヒトLN5の精製は既報 [Int. J. Cancer, 76, 63-72 (1998)] に従って実施した。すなわち、ヒト乳癌細胞MKN45 (Japan Cancer Research Resources Bankから入手) を、2.5%牛胎児血清および100 ng/mLフォルボール12-ミリステート13-アセテート (和光純薬工業社製) を含有する液体培地中にて培養した。その後、培養上清を採取し遠心分離にて細胞成分を除去した後に、上清にプロテアーゼ阻害剤を添加した。この培養上清を、抗LN5 $\gamma$ 2鎖ポリクローナル抗体を固定化したゲルを充填したカラムに流し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて十分に洗浄した。カラムに結合したLN5は、0.1M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) により溶出した。カラムから溶出したLN5を素早く中和し、透析チューブに入れてPBSに対して十分に透析した。このように精製したLN5標品をポリアクリルアミド電気泳動にて解析し、 $\alpha$ 3鎖と $\beta$ 3鎖と $\gamma$ 2鎖の存在を確認した。

この精製LN5を、Balb/C雌マウス (6週齢) の腹腔内へ、一匹当たり0.015 mgの量でコンブリート・フロイント・アジュバント (シグマアルドリッチ社製) とともに投与した。3週間後に同量のLN5をインコンブリート・フロイント・アジュバント (シグマアルドリッチ社製) とともに腹腔内へ投与した。さらに3週間後に同マウスへ精製LN5のみを一匹当たり0.03 mg投与した。

最終の免疫感作が終了した3日後にマウスから脾臓を摘出した。以降の作業は

無菌クリーンベンチ内で実施した。摘出した脾臓をメッシュで分散させ、あらかじめ培養しておいたSp2/0-Ag14マウスミエローマ細胞と混合し、50%ポリエチレングリコール1500（ペーリンガー・マンハイム社製）存在下で細胞融合した。融合したハイブリドーマ細胞は、96ウェルマイクロカルチャープレート数枚に分散させ、10%牛胎児血清とHAT試薬（ICNバイオメディカル社製）を含むRPMI1640液体培地中で1～2週間培養した。この間にモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマ細胞のみが生存し、融合しなかったミエローマ細胞やマウス脾臓細胞は死滅した。

LN5に対するモノクローナル抗体を産生する細胞の選択は抗原固相プレートによるELISAにより実施した。すなわち、ハイブリドーマ細胞のコロニーが十分に育った時点でその培養上清を採取し、免疫抗原を固相吸着した96ウェルマイクロプレート（ナルジェ・ヌンク社製）へ添加して、その上清中のモノクローナル抗体を反応させた。その後、マウスIgGに反応する2次抗体のペルオキシダーゼ標識物（アメリカンコーレックス社製）を適当な濃度で添加した。一定時間後にプレートを洗浄し、オルソフェニレンジアミン酵素基質発色剤（和光純薬工業社製）と過酸化水素の溶液を加えた。その発色の有無により目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを4株選択した。選択された4株は、それぞれ数回のクローニングを施し、19、57、8C2、2B10と命名した。それぞれのモノクローナル抗体の大量製造は、常法に従い、ハイブリドーマをマウスの腹腔内に接種し、そのマウスの腹水からプロテインG固定化セファロースゲル（ファルマシア社製）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することにより行った。

得られたモノクローナル抗体の特異性を、ヒト乳癌細胞MKN45細胞、ヒトグリア芽細胞種細胞株A-172細胞、ヒト平滑筋肉腫細胞株HT-1080細胞、及びヒト類表皮癌細胞株A-431細胞の産生するLN5により検討した。A-172細胞はAmerican Type Culture Collectionから、HT-1080細胞及びA-431細胞はJapan Cancer Research Resources Bankからそれぞれ入手した。

それぞれの細胞を、10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地で組織培養フラスコ中にて培養し、培養上清を採取した。培養上清から上述の方法によりLN5の精製を実施した。A-172細胞は $\gamma$ 2鎖を単体で分泌することが知られており、精製された

LN5は $\gamma$ 2鎖が主成分であった。それに対してMKN45細胞培養上清由来のLN5は $\alpha$ 3鎖と $\beta$ 3鎖と $\gamma$ 2鎖をほぼ同量含有していた。これら2種のLN5に対する4種のモノクローナル抗体の反応性を上述の方法に準じてELISAにて比較した。その結果、8C2のみが両者へ強く反応したことから、8C2モノクローナル抗体はLN5 $\gamma$ 2鎖を認識することが判明した(図1)。

また、HT-1080およびA-431の各細胞を培養する際に、エクスプレス $^{35}\text{S}$ プロテインラベリングミックス試薬(NENライフサイエンス社製)にて分泌タンパク質のラベルを行った。その培養上清を用いて4種のモノクローナル抗体による抗原タンパク質の免疫沈降を実施した。すなわち、 $^{35}\text{S}$ ラベルした各細胞培養上清一定量に抗体を添加し、抗マウスIgG抗体を固定化したゲルをさらに添加した。しばらくの間ゆっくりと攪拌した後に、低速遠心分離にてゲルを分離し、そのままSDS含有サンプル液にて加熱し、ゲルに吸着した抗原タンパク質を電気泳動にて分離した。

HT-1080細胞は、 $\alpha$ 3鎖を発現しておらず $\beta$ 3鎖と $\gamma$ 2鎖の複合体を分泌することが知られている。それに対してA-431細胞はすべての鎖を発現することが知られている。この免疫沈降物の電気泳動解析の結果、19と57はいずれも、HT-1080上清からの、分子量約145kDaの位置に泳動される抗原( $\beta$ 3鎖)に強く反応した。また、8C2は、HT-1080上清中からの、分子量約155kDaの位置に泳動される抗原( $\gamma$ 2鎖)に強く反応した(図2)。2B10反応抗原はHT-1080上清中に検出されなかった。4種のモノクローナル抗体はいずれも、A-431細胞培養上清からは $\alpha$ 3鎖、 $\beta$ 3鎖および $\gamma$ 2鎖の3本鎖複合体を沈降させた(図3)。

これらの実験結果より、19と57は $\beta$ 3鎖に、2B10は $\alpha$ 3鎖に、8C2は $\gamma$ 2鎖にそれぞれ反応することが判明した。19と57はいずれも $\beta$ 3鎖に同様に反応することから以降の検討においては57のみを使用した。

#### [実施例2] モノクローナル抗体によるヒト癌細胞培養上清中LN5量の測定

ヒト膵臓癌細胞株11種(KP-1、KP-2、KP-3、KP-4、AsPC-1、HPAC、SUIT-2、MI Apaca-II、PSN-1、BxPC-3、PANC-1:MI Apaca-II(CRL-1420)、PANC-1(CRL-1469)、AsPC-1(CRL-1682)及びHPAC(CRL-2119)はATCCから入手した。KP-1~KP-4、SUIT-2

及びBxPC-3は国立九州がんセンターの船越顕博先生より恵与された。PSN-1は国立がんセンターの西尾和人先生より恵与された。)を培養フラスコ中にて10%牛胎児血清添加RPMI-1640培地にて培養し、十分に生育した段階でその培養上清を採取した。培養上清は無菌的に密封し使用時まで4℃にて保存した。

実施例1にて作製され特異性が確認されたモノクローナル抗体3種(57、2B10、8C2)のうち、57および2B10モノクローナル抗体を過ヨウ素酸法にて西洋ワサビペルオキシダーゼ(ペーリンガー・マンハイム社製)により標識した。標識した各モノクローナル抗体はPBSに対して十分に透析し、メンブレンフィルター(日本ミリポア社製)にて濾過滅菌した後に4℃にて保存した。57または8C2の精製モノクローナル抗体を0.01 mg/mLとなるようにPBSにて希釈し、マキシソープ96ウェルマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに0.2 mL添加し、各抗体を固相化した。これらのプレートを乾燥しないように密封し4℃下で12時間以上静置した。その後、プレートの抗体溶液を廃棄して、1%スキミル含有PBS溶液を各ウェルに0.2 mL添加して1時間静置することによりプレートをブロッキングした。

ヒトLN5標準品(MKN45細胞由来)を1%スキミル含有PBS溶液にて希釈して1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 ng/mLの濃度となる溶液を調製した。ブロッキングが終了した抗体固相化プレートからブロッキング液を廃棄し、各ヒトLN5濃度標準品と既に採取した11種のヒト膵臓癌細胞培養上清をウェルに0.1 mLずつ添加した。そのまま室温にて2時間静置し、液を廃棄してPBSにて十分に洗浄した。上記の57または2B10モノクローナル抗体のペルオキシダーゼ標識物を1%スキミル含有PBSにて適度に希釈し、各ウェルに0.1 mLずつ添加した。そのまま室温にて2時間静置し、液を廃棄してPBSにて十分に洗浄した。ABTS酵素基質溶液(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を各ウェルに0.1 mLずつ添加し、時々攪拌しながら室温にて10分間静置した。反応を停止させるために2 mMアジ化ナトリウム水溶液をさらに0.1 mLずつ添加してよく混合した。各ウェルの492 nmにおける吸光度をT-maxマイクロプレートリーダー(モレキュラー・デバイス社製)にて測定し、標準品の吸光度から検量線を作製し、各培養上清中のLN5濃度を算定した。

測定の結果、一部のヒト膵臓癌細胞株でLN5の産生が確認され、8C2モノクローナル抗体を固相化抗体として用いたELISAによるLN5測定値が8C2モノクローナル抗体を用いないELISAによるLN5測定値に比較して明らかに低くなった（図4）。しかし、MKN45細胞の培養上清ではそのような低値傾向は検出されなかった。MKN45由来LN5は $\gamma$ 2鎖が断片化しないことが知られており、8C2は $\gamma$ 2鎖の遊離断片部位に反応特異性を有すると考えられた。

また、培養上清採取と同時にトリプシン処理にて上記11種のヒト膵臓癌培養細胞をフラスコから回収し、細胞数を計数した後にマイクロチューブに同じ細胞数となるように分注した。各チューブにヒト $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3、 $\alpha$ 5、 $\alpha$ 6、 $\beta$ 1、 $\beta$ 3、 $\beta$ 4インテグリンそれぞれに対するモノクローナル抗体（ケミコン社製）を添加し、30分間氷冷しながら静置した後にPBSにて細胞を洗浄し、FITC標識第2抗体を添加して30分間再び氷冷しながら静置した。最後にPBS洗浄をしたのちに1%パラホルムアルデヒド固定液を添加し、細胞表面抗原を固定した。各固定細胞浮遊液をFACSscanセルアナライザー（日本ベクトン・ディッキンソン社製）に通して細胞表面の蛍光強度平均値を測定し、細胞膜表面の各インテグリン発現量とした。蛍光強度平均値はバックグラウンド平均値に対する比（平均蛍光強度相対値：Relative Mean Fluorescence）として表示した。

ヒト膵臓癌細胞株11種のうち、LN5産生株6種とLN5非産生株5種での各種インテグリンの発現を比較した（図5）。LN5産生株ではLN5非産生株に比較して、 $\beta$ 1インテグリン等の発現はほぼ同等であるにも関わらず、明らかに $\beta$ 4インテグリンの発現が増大しており、LN5の産生量が $\beta$ 4インテグリン発現の指標となることが示された。

### 〔実施例3〕 $\gamma$ 2鎖分解断片に対するモノクローナル抗体の作製

#### （1） $\gamma$ 2鎖分解断片の精製

精製8C2モノクローナル抗体をブロムシアン活性化セファロース（ファルマシア社製）に使用説明書に従って架橋させ、抗体固相化ゲルを作製した。ヒト膵臓癌細胞株KP-2、またはBxPC-3を、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640液体培地にて組織培養フラスコ中にて大量に培養した。十分に培養した後に、その培養上清1 L

を採取し遠心分離により細胞成分を除去した。その培養上清をPBSにて希釈して、8C2モノクローナル抗体固定化ゲルを充填したカラムに流した。PBSにて十分にカラムを洗浄した後に、カラムに結合したLN5抗原を8 M尿素含有PBSによって溶出した。溶出した画分を透析チューブ内に入れてPBSに対して透析し、尿素を除去した。十分に透析を行った後にセントリコン遠心濃縮器（アミコン社製）にて濃縮し、精製ヒトLN5抗原とした。

この精製品を、4-20%グラジェントSDSポリアクリルアミド電気泳動（第一化学薬品社製）にて分離した。ゲルをクイックCBB染色液（和光純薬工業社製）にてタンパク質染色して、LN5抗原の分子量を解析した。また、同様に電気泳動したゲルからLN5抗原をイモビロン-Pメンブレン（日本ミリポア社製）に電氣的に転写し、8C2モノクローナル抗体にて免疫染色した（図6）。8C2モノクローナル抗体の反応する分解物は約5万と推定され、過去の論文報告 [Science, 277, 225-228 (1997)]においてタンパク質分解酵素による分解が原因となって遊離することが示唆されている $\gamma$ 2鎖のN末端由来の断片（N端断片）であると考えられた。ここで得られた精製ヒトLN5 $\gamma$ 2鎖N端断片は防腐剤を添加せず分注して使用時まで冷凍保存した。

## （2） $\gamma$ 2鎖分解断片に対するモノクローナル抗体の作製

冷凍保存していたKP-2細胞由来の精製 $\gamma$ 2鎖N端断片を免疫原として、新規なモノクローナル抗体の作製を実施した。モノクローナル抗体の作製は実施例1で述べた方法に準じて行った。新たに、2種のモノクローナル抗体KP2-LN5-8C2E 12-1（以後12-1と略記）とKP2-LN5-8C2E 18-4（以後18-4と略記）が取得された。ウェスタンブロット解析により、このいずれのモノクローナル抗体も、8C2と同様に分子量約5万の $\gamma$ 2鎖断片に反応することを確認した（図6）。

それぞれのモノクローナル抗体は、Hybridoma-SFM無血清培地（ギブコ社製）によるハイブリドーマ細胞の培養上清から、プロテインA固定化ゲルを用いてアフィニティー精製することにより大量製造した。得られたモノクローナル抗体はいずれもIgG1タイプであることをMouse-Typer Isotyping Panel試薬（日本バイオラッド社製）により確認した。

得られたモノクローナル抗体産生細胞（12-1、18-4、2B10、8C2、19および57）は、それぞれ、2001年8月16日にFPRM P-18465、FPRM P-18466、FPRM P-18467、FPRM P-18468、FPRM P-18469、FPRM P-18470の受託番号で独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（あて名：郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託され、2002年8月1日（57については2002年8月5日）に、ブタベスト条約に基く国際寄託に移管され、それぞれ、FERM B P-8133、FERM BP-8134、FERM BP-8135、FERM BP-8136、FERM BP-8137、FERM BP-8140の受託番号が付与されている。

### （3）生体試料中LN5分解物の測定

（2）で得られた抗ヒトLN5 $\gamma$ 2鎖モノクローナル抗体2種（12-1および18-4）を精製IgGとして用意した。

18-4モノクローナル抗体精製品を最終濃度0.2 mg/mLとしてPBSにて希釈した。抗体溶液1 mLに対して、ダイナビーズM-450エポキシル（ダイナル社製）浮遊液0.25 mLを添加し、ポリプロピレン容器に密封して室温にて4時間静かに攪拌した。その後、4℃にて12時間程度静置して結合を安定化させた。その後、ビーズ表面の余分な結合部位をブロックすることを目的として、抗体結合ビーズに対して、1%スキムミルク、0.1%アジ化ナトリウムおよび2 mM EDTAを含有するPBS溶液（以降SM/PBSと略記する）を2 mL添加した。そのまま12時間程度静置してブロッキングを安定化させた。その後、ビーズをPBSにて2回洗浄し、SM/PBS溶液にて20倍希釈して使用時まで4℃にて液状保存した。

12-1抗体精製品の最終濃度6 mg/mL溶液を調製した。その抗体溶液1 mLにルテニウム（アイジェン社製）約2 mgを添加し室温にて2時間静置した。その後0.2 M グリシン/PBS(pH 7.8) 2 mLを添加して余分な反応部位をブロックした。このルテニウム標識抗体液をウルトロゲルAcA44ゲルクロマトグラフィーにかけて、0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBSにて溶出し、最も最初に溶出されてくる標識された抗体を分離した。この様に調製されたルテニウム標識12-1モノクローナル抗体は使用時までそのまま4℃にて保存した。

ニワトリ血清（JRHバイオサイエンス社製）とSM/PBSを等量混合して、LN5標準

品希釈液および標識抗体希釈液として使用した（以降Diluentと略記する）。標準品としては、上記実施例1で得られたMKN45細胞由来精製LN5を使用し、LN5濃度が1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 ng/mLとなる様にDiluentにて希釈し標準品液を調製した。また、各ルテニウム標識抗体をDiluentにて100倍希釈した。生体試料の測定は自動測定器（ピコルム8220：三光純薬社製）にて実施した。標準品ならびにヒト血清及び血漿検体をそれぞれ0.2 mL採取し専用反応管に添加し、専用反応管ラックにセットした。調製した抗体結合ビーズと標識抗体もそれぞれ専用容器に入れて自動測定器にセットした。自動測定の工程は以下の通りであった。まず、反応管に0.025 mLの抗体結合ビーズを加え、約9分間間欠的に攪拌しながら第1抗体との反応を行う。反応管内の液を吸引除去後、洗浄液で2回洗浄する。洗浄後、0.2 mLのルテニウム標識抗体液を加え、約9分間間欠的に攪拌しながら第2抗体との反応を行う。反応管内の液を吸引除去後、洗浄液で2回洗浄する。洗浄後、0.3 mLの発行電解液を加え発光量を測定する。

同時測定した標準抗原より検量線を作製し、抗原濃度を算定した。Diluentのみの発光カウント数をブランク値とした。抗原濃度1000～15.625 ng/mLの間で良好な測定を実施できた（図7）。

#### 〔実施例4〕 ヒト癌を移植したヌードマウス血清中のLN5抗原

##### （1）ヌードマウスへのヒト脾臓癌細胞の同所移植

ヒト脾臓癌細胞株3種（HPAC、MIApaca-II、KP-1）をそれぞれ培養フラスコ中にて10%牛胎児血清添加RPMI-1640培地にて培養し、十分に生育した段階でトリプシン-EDTA液処理にて細胞のみを回収した。それぞれの細胞をよく洗浄して、麻酔下の8週齢ヌードマウス（日本チャールズリバー社製）の脾臓内へ同所移植した。各細胞を移植したマウスはクリーンルーム内にて飼育した。移植後2週間目、3週間目、4週間目、5週間目にそれぞれ3匹ずつを無作為に選出してエーテル麻酔下にて心臓より採血を実施した。採血した全血は4℃にて一晚清置した後に、遠心処理にて血清のみを分離した。分離した血清は測定まで冷凍保存した。また、採血後にマウスを解剖して原発脾臓腫瘍部を摘出し、重量を測定した。



## (2) マウス血清中LN5分解物の測定

実施例3(3)に記載の測定方法により、前項にて採取したマウス血清中LN5抗原の測定を実施した。測定の結果、HPAC細胞を移植したヌードマウスの血中へは、明らかに移植細胞由来のLN5抗原が遊離することが判明した。また、原発腫瘍の増大と相関してその血中濃度が上昇することも確認された(図8)。

また、LN5抗原の産生能のないMIApaca-II細胞を移植したヌードマウスでは原発腫瘍の増大は確認されたが、LN5抗原の血中濃度上昇はまったく検出されなかった(図9)。

さらに、実施例2での実験結果からKP-1細胞は $\alpha$ 3鎖および $\beta$ 3鎖の分泌能がないことが確認されており、LN5抗原を産生しないと想定されていたが、今回の検討でKP-1移植ヌードマウスの血中に原発腫瘍の増大と相関するLN5抗原濃度の上昇を検出した(図10)。これにより、KP-1細胞がLN5の $\gamma$ 2鎖モノマーを産生する性質を有する細胞であることが示され、本測定法によるLN5抗原測定が $\gamma$ 2鎖モノマー産生型の癌の検出にも有用であることが示された。

これらの結果により、本測定法によって、原発腫瘍での様々なタイプのLN5抗原の産生をモニターすることが可能であることが示された。

## [実施例5] ARDS(急性呼吸窮迫症候群)患者血中のLN5抗原濃度

LN5が生体内臓器の中でも特に肺上皮組織に多く含まれていることから、肺の炎症性疾患において生体内のLN5代謝が高まるのではないかと考え、健常人及びARDS患者から採取した血漿検体中のLN5抗原濃度を、実施例3(3)に記載の測定方法にて測定した。

健常人15例、ARDS患者生存例19例、ARDS患者死亡例8例の血漿中LN5抗原濃度を図11に示した。血漿中LN5抗原濃度は、それぞれ60.8 ng/mL、158 ng/mL、250.9 ng/mLとなり、明らかにARDS患者群で血中濃度が上昇することが判明した。このことから、LN5抗原が新たなARDS診断及び重症度判定用の血中マーカーとなることが確認された。

#### [実施例6] 各種消化器系癌患者血中のLN5抗原濃度

LN5は上皮系悪性腫瘍細胞からの産生が高いのではないかと考え、消化器系良性疾患患者31例（糖尿病患者8例、慢性膵炎患者25例）、粘液産生膵腫瘍患者9例、及び消化器系悪性腫瘍患者155例（膵臓癌患者36例、膵臓癌（肝臓転移）患者18例、胃癌患者10例、胆嚢・胆管癌患者16例、肝臓癌患者75例）から採取した血清検体中のLN5抗原濃度を、実施例3（3）に記載の測定方法にて測定した。

糖尿病患者8例、慢性膵炎患者25例、粘液産生膵腫瘍患者9例、膵臓癌患者36例、膵臓癌（肝臓転移）患者18例、胃癌患者10例、胆嚢・胆管癌患者16例、肝臓癌患者75例の血清中LN5抗原濃度を図12に示した。血清中LN5抗原濃度はそれぞれ平均値として、54.2 ng/mL、50.6 ng/mL、35.0 ng/mL、68.3 ng/mL、165.9 ng/mL、111.0 ng/mL、136.0 ng/mL、121.9 ng/mLとなり、明らかに各種消化器系癌患者群で血中濃度が上昇することが判明した。また、肝臓転移例においてその濃度が上昇する傾向を検出した。このことからLN5抗原が新たな消化器系悪性腫瘍の悪性度判定用の血中マーカーとなりうることが確認された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により生体試料中のLN5抗原の測定試薬及び測定方法が提供される。これにより、LN5を産生する癌細胞の検出、急性呼吸窮迫症候群の検査及び悪性腫瘍の悪性度の判定が可能となる。

## 請求の範囲

1. ラミニン 5  $\gamma$ 2鎖 N端断片に反応性を有する抗体と生体試料とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいてラミニン 5 抗原の量を決定する工程を含んでなる、生体試料中のラミニン 5 抗原を測定する方法。

2. 抗体が、FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

3. ラミニン 5  $\gamma$ 2鎖 N端断片に反応性を有する抗体を含有してなる、生体試料中のラミニン 5 抗原の測定試薬。

4. 抗体が、FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載のラミニン 5 抗原の測定試薬。

5. FERM BP-8136、FERM BP-8133またはFERM BP-8134の受託番号で寄託されている細胞により産生されるモノクローナル抗体。

6. 請求項 1 又は 2 に記載の方法により生体試料中のラミニン 5 抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン 5 抗原の測定結果に基づいてラミニン 5 を産生する癌細胞を検出する工程を含んでなる、ラミニン 5 を産生する癌細胞を検出する方法。

7. 請求項 3 又は 4 に記載の測定試薬を含んでなる、ラミニン 5 を産生する癌細胞の検出用の検査試薬。

8. 請求項 1 又は 2 に記載の方法により生体試料中のラミニン 5 抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン 5 抗原の測定結果に基づいて急性呼吸窮迫症候群を検査する工程を含んでなる、急性呼吸窮迫症候群を検査する方法。

9. 請求項 3 又は 4 に記載の測定試薬を含んでなる、急性呼吸窮迫症候群の検査用の検査試薬。

10. 請求項 1 又は 2 に記載の方法により生体試料中のラミニン 5 抗原を測定する工程、及び、前記ラミニン 5 抗原の測定結果に基づいて悪性腫瘍の悪性度を判定する工程を含んでなる、悪性腫瘍の悪性度を判定する方法。

11. 請求項 3 又は 4 に記載の測定試薬を含んでなる、悪性腫瘍の悪性度の判

定用の検査試薬。

12. ラミニン5に反応性を有する抗体と、細胞の培養上清とを接触させる工程、前記抗体の反応を測定する工程、及び、前記反応の測定結果に基づいて前記細胞の $\beta$ 4インテグリンの発現量を決定する工程を含んでなる、 $\beta$ 4インテグリン発現を測定する方法。

1/8

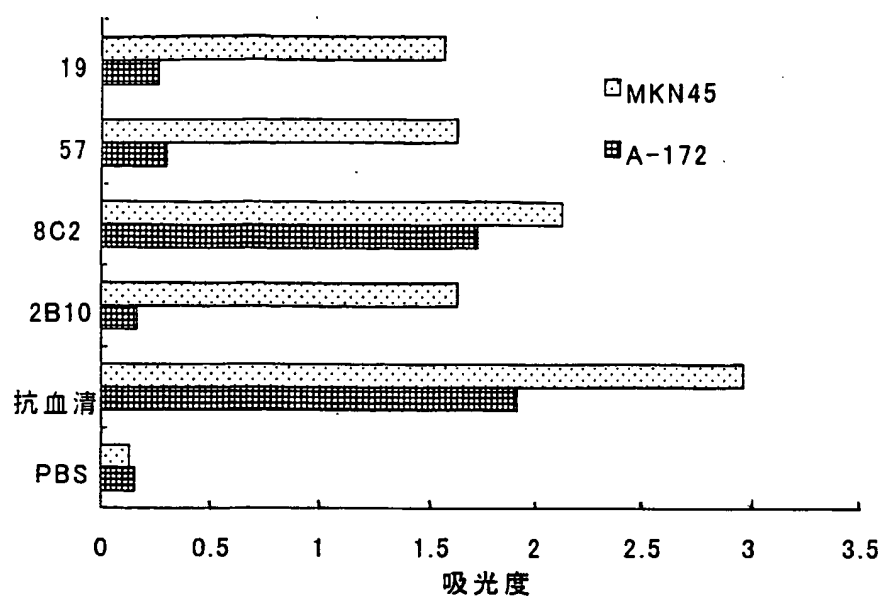


図 1

2/8

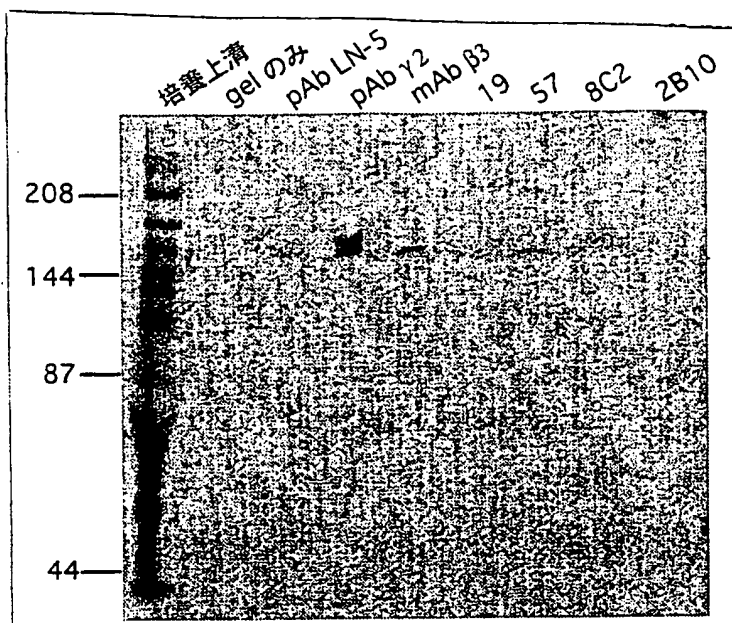


図 2

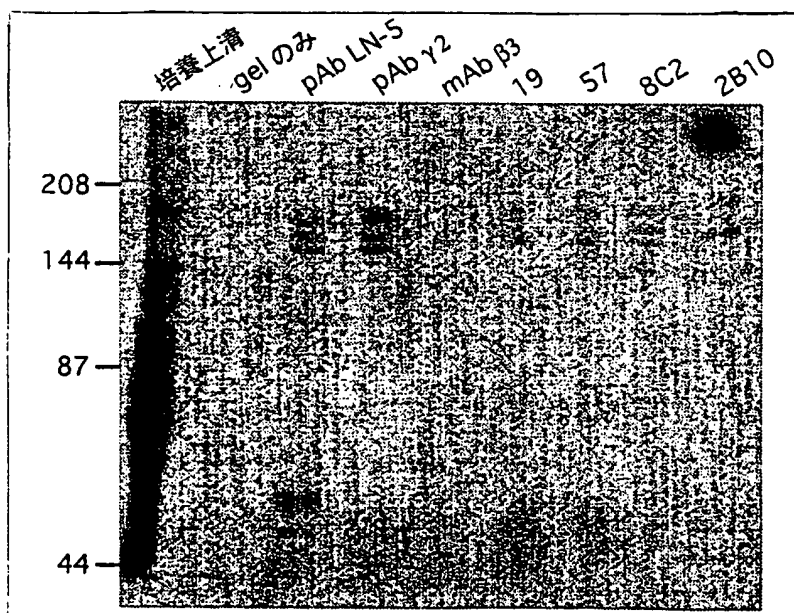


図 3

3/8

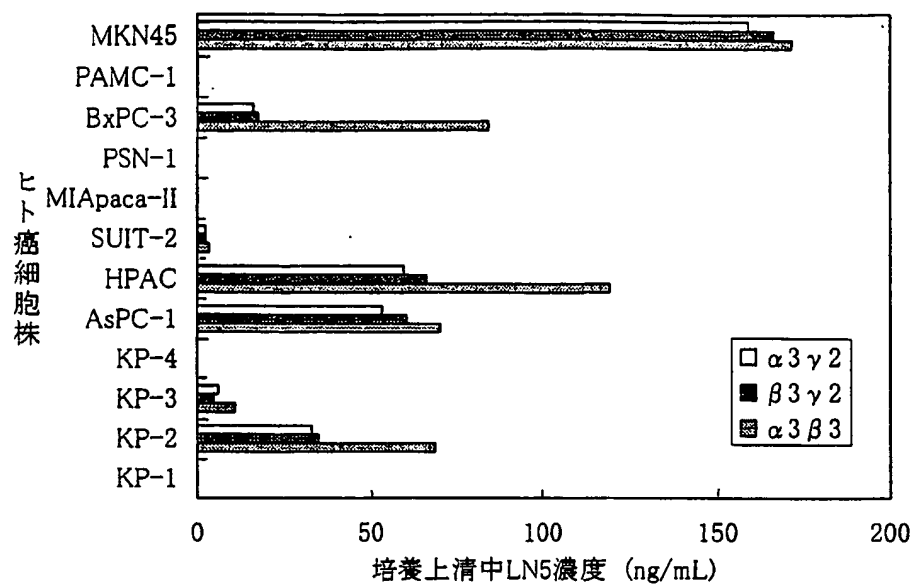


図 4

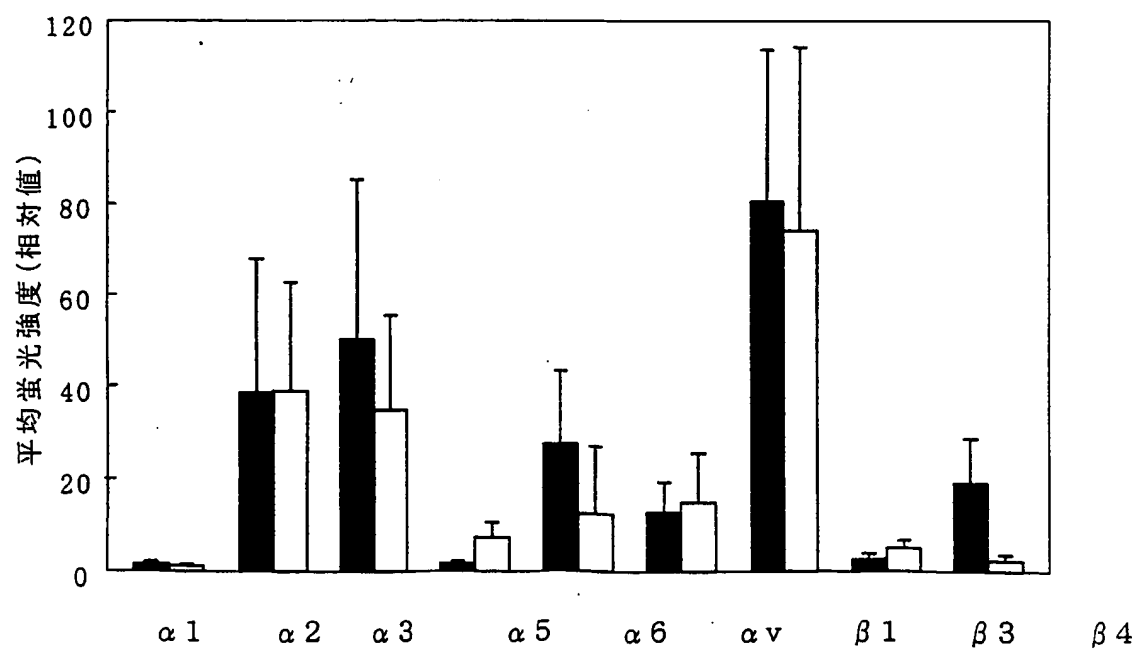


図 5

4/8

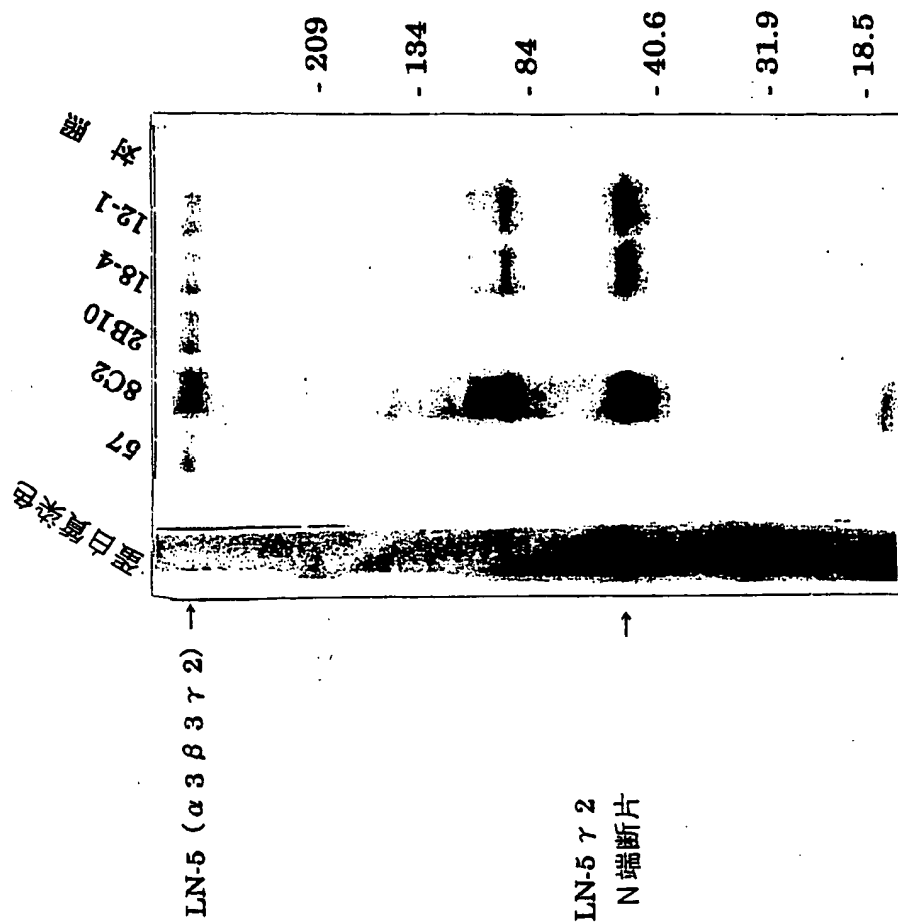


図 6



5/8

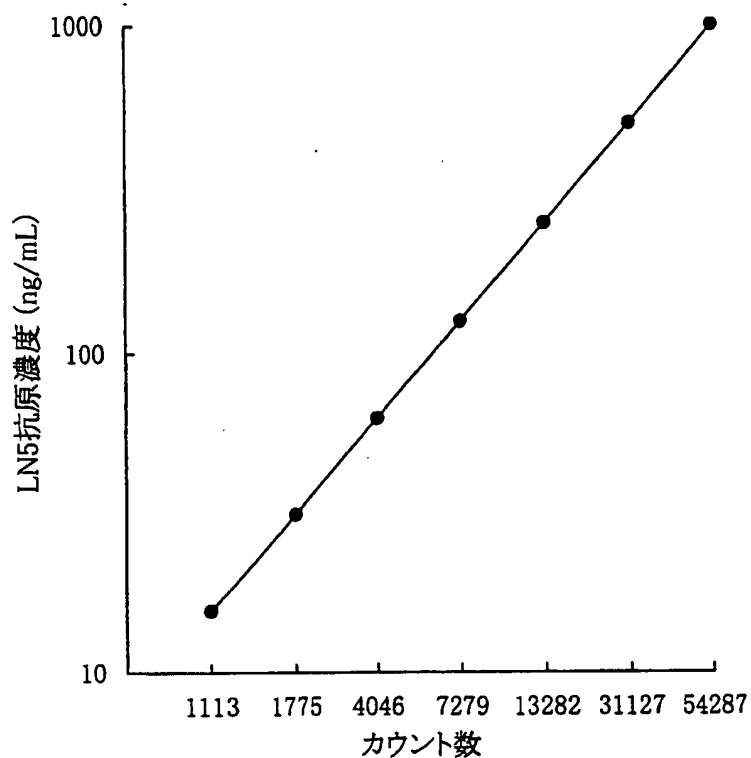


図 7

HPAC移植ヌードマウスの  
腫瘍重量と血清中LN5抗原濃度

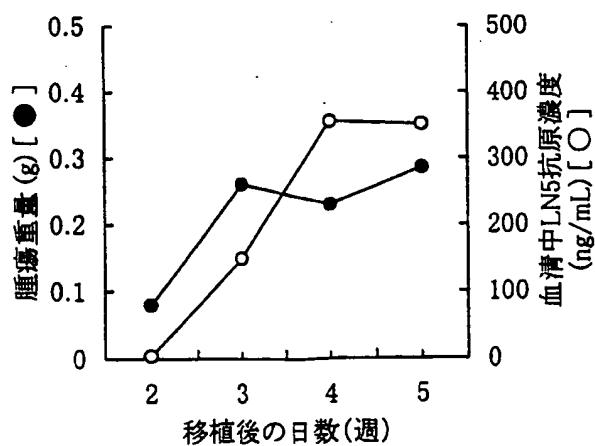


図 8

6/8

MIAPaca-II移植ヌードマウスの  
腫瘍重量と血清中LN5抗原濃度

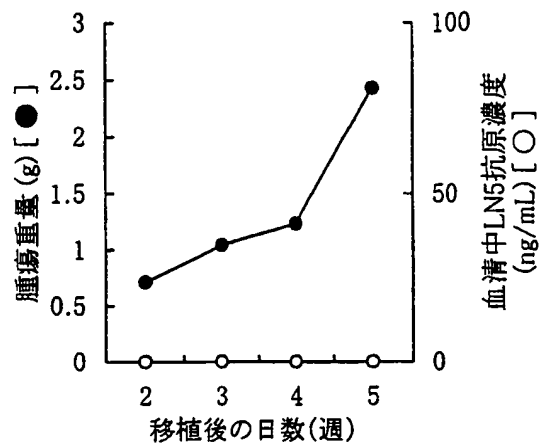


図 9

KP-1移植ヌードマウスの  
腫瘍重量と血清中LN5抗原濃度

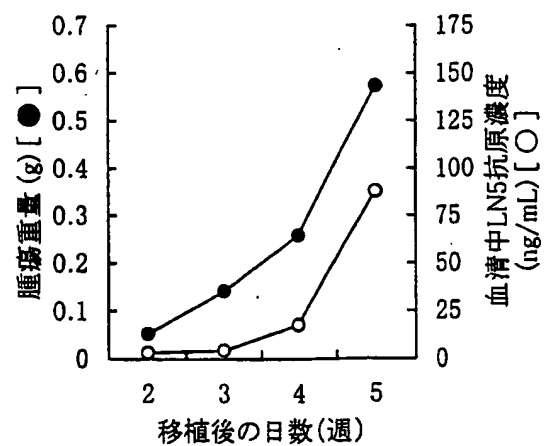


図 10

7/8

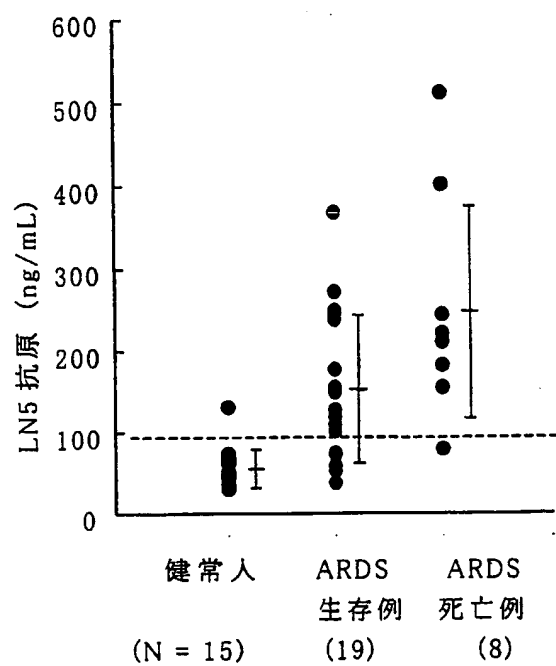


図 1 1

8/8

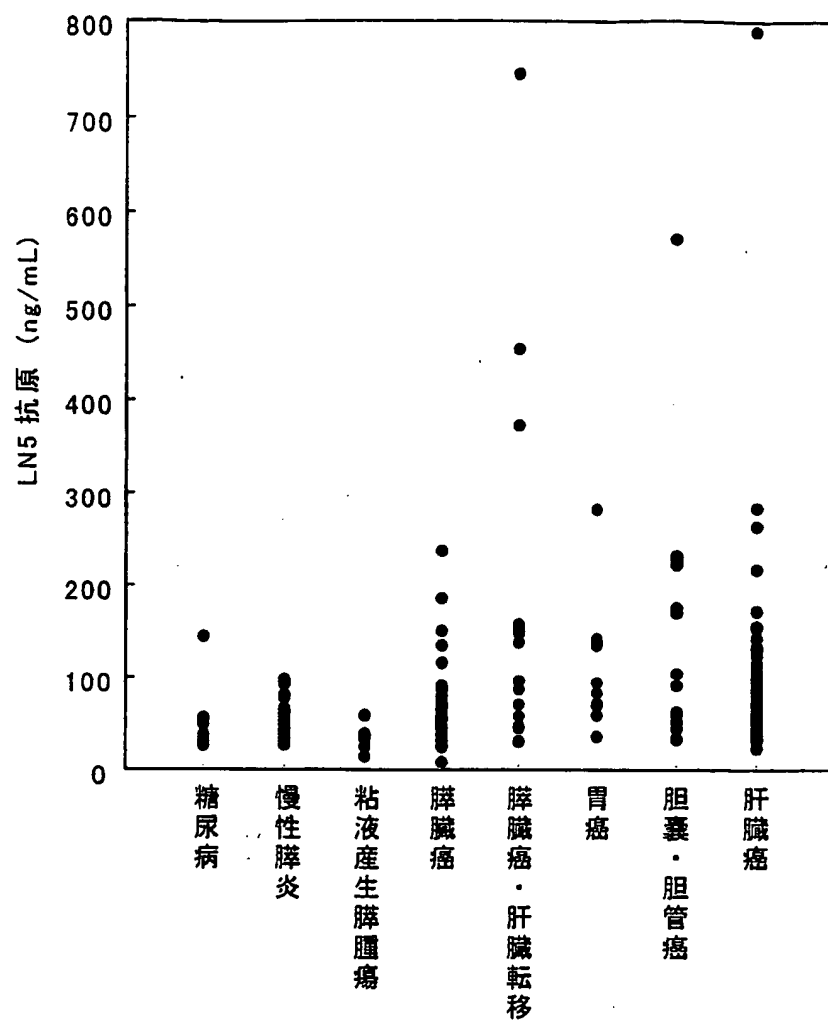


図 1 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08347

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAGNOUX-PALACIOS et al., "The short arm of the laminin gamma2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion", 2001 May, The Journal of Cell Biology, Vol.153, No.4, p835-849, see Abstract, p835 right column, p836 left column the last paragraph, Fig. 1, p839 left column the last paragraph-p840 right column, p841 left column, p847 left column the last paragraph	1-7,10-12
Y		8,9
P,X P,Y		1-7,10-12 8,9
	Takako SASAKI et al., "Short arm region of Laminin-5 gamma2 chain", 2001 December, Journal of Molecular Biology, p751-763	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October, 2002 (17.10.02)

Date of mailing of the international search report

05 November, 2002 (05.11.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08347

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ryokuhei MANDA et al., "Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small vell and non-small cell lung carcinomas", 2000, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.275, p440-445, Abstract	8, 9, 12
A	JP 2001-172196 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 26 June, 2001 (26.06.01), (Family: none)	1-12
A	Naohiko KOSHIKAWA et al., "Overexpression of Laminin gamma2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells", 1999, Cancer Research, Vol.59, No.21, p5596-5601	1-12

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	GAGNOUX-PALACIOS et al, 'The short arm of the laminin gamma a2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion' 2001 May, The Journal of Cell Biology, Vol. 153, No. 4, p835-849, see Abstract, p835 right column, p836 left column the last paragraph, Figure 1, p839 left column the last paragraph-p840 right column, p841 left column, p847 left column the last paragraph	1-7, 10-12
Y		8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵



2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	Takako SASAKI et al, 'Short arm region of Laminin-5 gamma2 chain' 2001 December, Journal of Molecular Biology, p751-763	1-7, 10-12 8, 9
Y	Ryokuhei MANDA et al, 'Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas' 2000, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.275, p440-445, Abstract	8, 9, 12
A	JP 2001-172196 A, (オリエンタル酵母工業株式会社) 2001.06.26 (ファミリーなし)	1-12
A	Naohiko KOSHIKAWA et al, 'Overexpression of Laminin gamma2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells' 1999, Cancer Research, Vol.59, No.21, p5596-5601	1-12